



Description des écotypes du phylotype II dans le complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*: diversité et évolution

Gilles Cellier

► To cite this version:

Gilles Cellier. Description des écotypes du phylotype II dans le complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*: diversité et évolution. Sciences agricoles. Université de la Réunion, 2010. Français. NNT: 2010LARE0018 . tel-00716870

HAL Id: tel-00716870

<https://theses.hal.science/tel-00716870>

Submitted on 11 Jul 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LA REUNION

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE DE LA REUNION N°0445

UFR Sciences et Technologies ; Spécialité Biologie Moléculaire

UMR Peuplements Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical

CIRAD – Université de la Réunion

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 13 décembre 2010

Par

Monsieur Gilles CELLIER

DESCRIPTION DES ECOTYPES DU PHYLOTYPE II DANS LE COMPLEXE D'ESPECES

RALSTONIA SOLANACEARUM : DIVERSITE ET EVOLUTION

Directeur de thèse : Philippe PRIOR

JURY

| | | |
|-------------------|---|--------------------|
| Caitilyn ALLEN | Professeur, Université du Wisconsin, États-Unis | Rapporteur |
| Stéphane POUSSIER | Maitre de conférences, Agrocampus Ouest, Angers | Rapporteur |
| Jaap JANSE | Directeur de Recherche, NAK, Pays-Bas | Examineur |
| Philippe PRIOR | Directeur de Recherche, Inra-Cirad, Réunion | Directeur de thèse |
| Bernard REYNAUD | Directeur de Recherche, Cirad, Réunion | Président du jury |

Un grand MERCI...

Tout d'abord pour **Bernard Reynaud**, qui m'a accueilli au sein de son unité : l'UMR Peuplements Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical, ainsi que le CIRAD pour m'avoir accueilli dans ses locaux.

Aux membres du jury pour s'être déplacé de l'autre côté du globe, et tout particulièrement à mes rapporteurs de thèse : **Caitilyn Allen** et **Stéphane Poussier**.

À **Philippe Prior** pour m'avoir encadré durant ces trois années ; pour m'avoir donné les conseils et l'envie de faire de la science ; pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet de Recherche... Pour toute ma thèse, et bien plus.

Un grand merci aussi pour l'équipe Ralsto, avec le côté technique : **Jean Jacques** pour tout le pan microbiologie, **Sylvain** et **Jean Michel** pour l'excellente production végétale qui a malheureusement fini par être inoculée... **Benoit**, pour son expertise dans le domaine des puces à ADN, le côté scientifique en général et les nombreuses relectures de papiers, dossiers, manuscrits... **Aurore** pour avoir partagé ses collections de plantes ainsi que ses loukoums et autre mets. Une belle équipe avec qui il a été plus qu'agréable de travailler.

Je remercie également **Xavier Vant** et **Bruno Hostachy** qui ne sont pas étrangers à ma venue sur l'île. Cette opportunité grandiose de travailler dans cette équipe et dans ce centre de recherche leur revient de droit.

Tout particulièrement aussi à **David Caffier**, pour sa franchise, sa disponibilité, ses conseils et son amitié.

Merci à toutes les personnes du Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche qui ont été impliquées dans l'organisation administrative de cette Formation Complémentaire par la Recherche. Particulièrement **Cyril Kao** et **Hafida Boyer** qui ont su répondre à chacun de mes multiples questionnements et interrogations.

Je remercie également ce microcosme qui structure parfaitement le CIRAD 3P dans un environnement de travail de qualité : les chercheurs pour leurs appuis scientifiques: **Olivier, Christian, Lionel, Isabelle, Fred, Pierre** et les autres ; les techniciens qui

m'ont donné un accueil chaleureux et avec qui il est très plaisant d'échanger ; les VCAT et stagiaires, les éphémères de ces trois années qui m'ont donné l'opportunité de partager de nombreux et agréables moments, notamment **Benoit, Natacha, David, Seb, Sabrina, Camille, Christopher, Claire** (les 2), **Flora, FX, Gabriel, Paul, Sylvaine...**

Merci pour l'opportunité d'avoir connu des personnes qui me sont chères : Nathalie et par ordre chronologique : **Lan, Liliane, Benjamin, Simon, Julien, Steph, Chloé, Julie & Max, Aline & Mayeul, Jean Charles, Alex, Mattieu & Gaëlle**

Merci à tous les thésards de la Réunion avec qui j'ai passé de très bons moments, une belle promotion que je suis toujours très heureux de revoir à l'occasion de passages à Saint-Denis.

Un merci aussi en vrac pour le Delirium café, qui a su fermer à temps pour que je puisse poursuivre ma thèse ; le Snack OI avec **Estelle, François** et **Jean** ; les sentiers de la Réunion qui m'ont permis de faire des centaines et des centaines de kilomètres sur cette île ; Éric de l'étang salé ; Régis du Toit.

J'en oublie certainement de ces personnes qui ont gravité dans mon environnement, m'apportant de belles théories, de bons fous rires, de mémorables instants... À toutes ces personnes, je vous dis merci.

Pour finir, je tiens à remercier toute ma famille qui a toujours été auprès de moi, malgré la distance et mes deux retours en métropole durant cette période.

À ma mère,

Sans qui tout cela n'aurait pas été possible...

Sommaire

| | |
|-------------------|---|
| Introduction..... | 1 |
|-------------------|---|

| | |
|---|---|
| Chapitre 1 : Synthèse bibliographique <i>Ralstonia solanacearum</i> et le flétrissement bactérien | 5 |
|---|---|

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Cycle biologique et épidémiologie..... | 6 |
| 2 | Quorum-sensing et conversion phénotypique | 8 |
| 3 | Mécanismes d'invasion de l'hôte | 10 |
| 4 | Diagnostic | 11 |
| 4.1 | La sérologie | 14 |
| 4.2 | Les technologies de l'ADN | 14 |
| 4.3 | Comparaison des méthodes | 16 |
| 5 | Le flétrissement bactérien | 16 |
| 5.1 | Les plantes hôtes | 17 |
| 5.1.1 | Pomme de terre (Brown rot) | 17 |
| 5.1.2 | Tomate et tabac | 18 |
| 5.1.3 | Ornementales | 18 |
| 5.1.4 | Bananier et plantes associées..... | 19 |
| 5.1.4.1 | La maladie de Moko | 19 |
| 5.1.4.2 | La maladie de Bugtok | 20 |
| 5.1.4.3 | La maladie du sang (Blood Disease Bacterium)..... | 20 |
| 5.1.5 | Giroflier (maladie de Sumatra) | 21 |
| 6 | Méthodes de lutte | 22 |
| 7 | Taxonomie du complexe d'espèces..... | 24 |
| 7.1 | Le genre <i>Burkholderia</i> | 24 |
| 7.2 | Le genre <i>Ralstonia</i> | 26 |
| 7.3 | Le complexe d'espèces | 27 |

| | | |
|---------|--|----|
| 7.3.1 | La classification en races | 27 |
| 7.3.1.1 | Race 1 | 28 |
| 7.3.1.2 | Race 2 (<i>Musacées et ornementales</i>)..... | 28 |
| 7.3.1.3 | Race 3 (<i>Pomme de terre</i>)..... | 29 |
| 7.3.1.4 | Race 4 | 30 |
| 7.3.1.5 | Race 5 | 30 |
| 7.3.2 | La classification en Biovars | 30 |
| 7.3.3 | Phylogénie du complexe d'espèces | 32 |
| 7.3.3.1 | La classification et les technologies de l'ADN..... | 32 |
| 7.3.3.2 | Le schéma de classification en phylotypes et sequevars | 34 |
| 8 | Organisation du génome | 35 |
| 8.1 | Description..... | 35 |
| 8.2 | Mécanismes du pouvoir pathogène | 38 |

Questions de Recherche..... 41

Chapitre 2 Les écotypes africains 43

| | |
|------------------------------|----|
| Conclusions partielles | 53 |
|------------------------------|----|

Chapitre 3 Diversité génétique et phénotypique dans le phylotype II..... 55

| | |
|------------------------------|----|
| Conclusions partielles | 69 |
|------------------------------|----|

Chapitre 4 Génomique comparative du complexe d'espèces..... 72

| | |
|------------------------------|----|
| Conclusions partielles | 90 |
|------------------------------|----|

Chapitre 5 Dynamique évolutive du génome..... 93

| | | |
|-----|---|-----|
| 1 | Les puces à ADN | 94 |
| 1.1 | Applications générales des puces à ADN..... | 96 |
| 1.2 | Application à l'aCGH | 98 |
| 1.3 | Application au diagnostic..... | 98 |
| 1.4 | Les paramètres de l'hybridation..... | 99 |
| 1.5 | L'analyse des images | 100 |
| 2 | La puce pangénomique | 102 |
| | Conclusions partielles | 119 |

Conclusions générales et perspectives 121

| | | |
|---|--|-----|
| 1 | Les écotypes | 122 |
| 2 | La dynamique des génomes | 129 |
| 3 | La biologie est-elle technologie ? | 133 |
| 4 | <i>In fine</i> | 134 |

Références bibliographiques..... 138

Table des illustrations

| | |
|--|----|
| <u>Figure 1.</u> Quorum sensing chez <i>Ralstonia solanacearum</i> | 8 |
| <u>Figure 2.</u> Culture de <i>Ralstonia solanacearum</i> sur milieu gélosé Kelman..... | 8 |
| <u>Figure 3.</u> Cycle infectieux de <i>Ralstonia solanacearum</i> | 10 |
| <u>Figure 4.</u> Survie de <i>Ralstonia solanacearum</i> dans des tubercules de pomme de terre à température froide | 11 |
| <u>Figure 5.</u> Symptômes causés par <i>Ralstonia solanacearum</i> sur tubercules de pomme de terre | 12 |
| <u>Figure 6.</u> « Test de l'eau » | 12 |
| <u>Figure 7.</u> Gel d'électrophorèse de la PCR multiplexe sur <i>Ralstonia solanacearum</i> | 15 |
| <u>Tableau 1.</u> Comparaison de la sensibilité des méthodes de détection de <i>Ralstonia solanacearum</i> | 16 |
| <u>Figure 8.</u> Symptômes caractéristiques provoqués par <i>Ralstonia solanacearum</i> sur <i>Solanaceae</i> | 17 |
| <u>Figure 9.</u> Flétrissement causé par <i>Ralstonia solanacearum</i> sur tomate..... | 18 |
| <u>Figure 10.</u> Flétrissement causé par <i>Ralstonia solanacearum</i> sur géranium | 18 |
| <u>Tableau 2.</u> Description des différentes souches de <i>Ralstonia solanacearum</i> provoquant la maladie de Moko..... | 19 |
| <u>Figure 11.</u> Flétrissement causé par l'écotype Moko de <i>Ralstonia solanacearum</i> sur banane | 20 |
| <u>Figure 12.</u> Maladie du sang du bananier causée par le Blood Disease Bacterium (BDB) | 20 |
| <u>Figure 13.</u> La maladie de Sumatra du giroflier (<i>Syzygium aromaticum</i> (L.)) causée par <i>Ralstonia syzygii</i> et son insecte vecteur (<i>Hindola</i> spp) | 21 |
| <u>Figure 14.</u> Réponse hypersensible sur feuille de tabac (<i>Nicotiana tabacum</i>)..... | 28 |

| | |
|---|-----|
| <u>Tableau 3.</u> Tests physiologiques révélant la classification de <i>Ralstonia solanacearum</i> en Biovars | 30 |
| <u>Tableau 4.</u> Classification de <i>Ralstonia solanacearum</i> en Races et Biovars | 31 |
| <u>Tableau 5.</u> Correspondance des systèmes de classification de <i>Ralstonia solanacearum</i> basés sur le phénotype (Races et Biovars) et sur les technologies de l'ADN (Phylotypes, sequevars, RFLP, 16S et MLG) | 34 |
| <u>Figure 15.</u> Phylogénie du complexe d'espèces <i>Ralstonia solanacearum</i> | 35 |
| <u>Figure 16.</u> Analyse du complexe d'espèces <i>Ralstonia solanacearum</i> basée sur l'ANI (Average Nucleotide Identity) | 35 |
| <u>Figure 17.</u> Nombre de publications annuelles relatives aux puces à ADN | 94 |
| <u>Figure 18.</u> Nombre de génomes séquencés à ce jour | 94 |
| <u>Figure 19.</u> Comparaison des technologies majeures de puces à ADN | 95 |
| <u>Figure 20.</u> Flux de travail employé pour une puce à ADN CGH bicouleur | 98 |
| <u>Figure 21.</u> Courbe de raréfaction pour le séquençage des souches de <i>Ralstonia solanacearum</i> | 102 |
| <u>Figure 22.</u> Depletion curves | 108 |
| <u>Figure 23.</u> Phylogenetic structure of <i>Ralstonia solanacearum</i> species complex..... | 109 |
| <u>Figure 24.</u> Genes class distribution | 110 |
| <u>Figure 25.</u> Ancestral reconstruction of <i>Ralstonia solanacearum</i> phylogeny | 111 |
| <u>Table 6.</u> Bayesian clustering analysis with STRUCTURE software on brown rot strains from phylotypes IIB-1 and IIB-2 | 112 |
| <u>Table 7.</u> Bayesian clustering analysis with STRUCTURE software on Moko disease causing strains from phylotypes IIA-6, IIB-3, IIB-4, IIB-4NPB, and IIB-51..... | 113 |
| <u>Figure 26.</u> Synthèse d'oligonucléotide et de gènes : coût et productivité | 133 |

Liste des abréviations

| | |
|--------|--|
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADNc | ADN complémentaire |
| AFLP | <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ARNm | Acide ribonucléique messager |
| ARNr | ARN ribosomal |
| ATP | Adénosine Triphosphate |
| AVRDC | <i>Asian Vegetable Research and Development Centre</i> |
| BDB | Blood disease bacterium |
| Bv | Biovar |
| cfu | <i>Colony-forming unit</i> |
| Cirad | Centre de Coopération Internationale pour la Recherche Agronomique et le Développement |
| HR | <i>Hypersensitive response</i> |
| Inra | Institut National de la Recherche Agronomique |
| Kb | Kilo base (10 ³ bases) |
| Mb | Méga base (10 ⁶ bases) |
| NaCl | Chlorure de sodium |
| pb | Paire de base nucléotidique |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| SMSA | <i>Semi-selective medium, South Africa</i> |
| SSTIII | Système de sécrétion de type III |
| Tris | Trishydroxyméthylaminométhane, ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol |
| VNC | Viable, mais non cultivable |

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Dans un contexte de changement climatique global, tant dans les pays du Nord que du Sud, les questions de recherche sont en constantes évolutions, en particulier s'agissant de l'alimentation associée à une production durable, de qualité, plus respectueuse de l'environnement et du consommateur. La protection des cultures contre toutes formes d'agression biologique reste d'évidence un domaine stratégique où toutes avancées seront sans doute décisives pour assurer aux récoltes à la fois des rendements acceptables (sécurité alimentaire) et des produits de qualité. Contrôler les bioagresseurs nécessite une approche pluridisciplinaire allant du fonctionnement des écosystèmes associé à l'épidémiologie, jusqu'aux différents processus physiologiques et moléculaires qui régissent les interactions entre la plante et l'agent pathogène.

La plante impacte directement sur son environnement, en particulier sur les propriétés physico-chimiques du sol au niveau de la rhizosphère. La croissance et la physiologie de la plante induisent des changements sur le plan de la minéralisation, de la teneur en matière organique, du pH, de la salinité et de la disponibilité en eau. Ces changements favorisent le développement de communautés bactériennes en interaction (Atlung & Ingmer, 1997; Baudoin, Benizri, *et al.*, 2002; Dubey, Tripathi, *et al.*, 2005; Flavier, Clough, *et al.*, 1997). Les études les plus récentes de phylogéographie assorties à des méthodes de datations indiquent clairement que dès leur apparition les plantes ont été des hôtes naturels des bactéries (Gehrig, Schussler, *et al.*, 1996), procurant une grande diversité d'habitats aux caractéristiques avantageuses au bénéfice de la croissance bactérienne : support de développement, taux d'humidité relativement constant et nutriments.

Les organismes bactériens associés aux plantes sont donc très diversifiés et hautement adaptés à leur environnement (Alfano & Collmer, 1996) et forment de véritables communautés bactériennes complexes (Buckley & Schmidt, 2003; Buyer, Roberts, *et al.*, 2002). L'importance des taxons bactériens concernés atteste d'une diversité exceptionnelle et leurs présences dans de très nombreux taxons chez les procaryotes suggèrent de grandes variations en matière de diversités génétique et phénotypique, et naturellement écologique. Alors que certaines de ces bactéries sont commensales strictes, comme *Symbiobacterium thermophilum* (Ueda, Yamashita, *et al.*, 2004), ne survivant qu'à la surface de leurs hôtes sans apporter d'avantages ou d'inconvénients ; d'autres possèdent des propriétés d'importance agronomique ou environnementale (Curtis & Sloan, 2004), traduites par des phénomènes de mutualisme avec leurs hôtes. Le plus remarquable est l'association symbiotique plante-bactérie développée lors de la formation de nodules fixateurs de l'azote

moléculaire atmosphérique en azote organique : la plante bénéficie ainsi d'un apport azoté nécessaire à sa croissance et la bactérie bénéficie d'un habitat exclusif sur le long terme (Elliott, Chen, *et al.*, 2007; Nap & Bisseling, 1990; Nelson & Child, 1981; Vandamme, Goris, *et al.*, 2002; Vasse, de Billy, *et al.*, 1990). À l'inverse, on observera des bactéries phytopathogènes capables de provoquer des dérèglements physiologiques chez la plante hôte pouvant aller jusqu'à la mort. Les dégâts peuvent être importants et provoquer des épidémies sur de vastes territoires aux impacts socio-économiques considérables, comme pour le feu bactérien dû à *Erwinia amylovora* (Grimault, Gelie, *et al.*, 1994), ou encore dans les régions tropicales sur les cultures de manioc attaquées par *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Lozano, 1986). Notons que le pouvoir pathogène chez les bactéries reste une exception si l'on considère le peu de genres concernés face à l'immensité du monde bactérien. Si l'on excepte les procaryotes fastidieux (difficilement ou non cultivables), les bactéries phytopathogènes tombent dans moins de 10 genres. Néanmoins, leurs impacts sociaux économiques sont considérables eu égard au développement de l'agriculture moderne.

Sur le plan de l'écologie, la plante offre un habitat de choix pour les communautés microbiennes, en particulier au niveau de la phyllosphère, qui se définit par l'ensemble des régions externes émergentes, comme les feuilles, la tige et les fruits ; au niveau de la rhizosphère, qui se définit par les régions du sol sous l'influence directe du système racinaire ; mais aussi au niveau des tissus vasculaires et des sites endophytes, qui se définissent par les tissus internes tels que ceux des bourgeons, des tiges et les espaces intercellulaires. Alors que la phyllosphère abrite de larges communautés bactériennes diversifiées (Hentschel, Steinert, *et al.*, 2000), elle est exposée à de nombreux et violents changements atmosphériques et possède un caractère instable en relation avec le stade phénologique de l'hôte. La rhizosphère offre cependant des conditions de croissance plus stable et supporte des communautés bactériennes plus complexes où la concurrence trophique est moins forte (Kiers & Denison, 2008; Kluepfel, 1993). À l'inverse, les tissus internes des plantes sont plus complexes et ne permettent généralement l'établissement que d'une communauté bactérienne marginale. Les tissus vasculaires sont généralement distincts des sites endophytes et sont constitués par le xylème et phloème, offrant des opportunités de colonisation à des bactéries spécialisées (Purcell & Hopkins, 1996; Vojnov, do Amaral, *et al.*, 2010) et des contraintes différentes : les vaisseaux du phloème, constitués de cellules vivantes, transportent de façon ascendante et descendante une sève élaborée contenant des sucres fabriqués dans les feuilles. Ils nécessitent à la bactérie de disposer de mécanismes *ad hoc* pour pénétrer dans les vaisseaux du phloème, allant jusqu'à requérir l'adaptation à un insecte, piqueur-suceur par exemple (Chatterjee, Almeida, *et al.*, 2008; Eden-Green, Balfas, *et al.*, 1992). En revanche, les vaisseaux du xylème sont constitués de

cellules mortes et transportent de façon ascendante une sève brute, c'est-à-dire une solution diluée de faible apport nutritif, de minéraux et de composés organiques simples issue de l'absorption racinaire. Les bactéries phytopathogènes se développent au détriment de leur hôte en y provoquant des symptômes qui peuvent se décliner d'une part au plan local par un phénomène de mort cellulaire provoquant des dessèchements, et d'autre part sur le plan global par le développement de pourriture, de gales, de chancres, de tumeurs résultant en la prolifération anarchique de tiges ou racines. Ces symptômes évoluent jusqu'à se généraliser et provoquer des décolorations, le flétrissement ou encore la liquéfaction des tissus. Ces symptômes impactent directement sur les rendements des cultures.

Contrairement au traitement des champignons, les méthodes de lutte contre les bactéries en général, et *a fortiori* contre celles qui sont adaptées à la survie dans le sol ou la rhizosphère, restent très limitées si l'on écarte de manière justifiée l'usage de biocides totaux ou d'antibiotiques. D'où l'importance de caractériser de manière approfondie les interactions entre la plante et la bactérie. En effet, les nombreux déterminants de la virulence peuvent avoir subi des pressions de sélection telles, que la physiologie de ces organismes et les mécanismes de pathogénie tendent à refléter une spécialisation à l'hôte. Ces évolutions peuvent se faire par des mutations et des réarrangements génétiques (évolution verticale), mais aussi par une sélection adaptative du contenu en gènes de leurs génomes par le biais de transferts horizontaux de gènes : conjugaison, transduction et transformation naturelle (Ochman, Lawrence, *et al.*, 2000). Une partie de mes travaux de recherches visent à déterminer si la relation existe entre spécialisation parasitaire, contenue en gènes, architecture et dynamique du génome.

R. solanacearum est un organisme modèle pour l'étude des interactions plante-pathogène, et ce, à bien des égards. Les milliers de souches connues couvrent une exceptionnelle diversité génétique attestée par les données phylogénétiques les plus récentes. En fait, ces souches constituent un véritable complexe d'espèces dans lequel certaines souches sont assignées dans différents écotypes, à savoir des souches partageant la même niche écologique (Cohan, 2001), et d'autres dont le spectre d'hôtes déjà large ne cesse d'évoluer (Denny, 2006; Hayward, 1991; Wicker, Grassart, *et al.*, 2007; Wicker, Grassart, *et al.*, 2002). *R. solanacearum* est représentatif d'organismes vasculaires d'origine tellurique dont la multiplication dans le xylème induit un flétrissement de la plante. Les dégâts sur les cultures sont conséquents et sont estimés annuellement pour la filière pomme de terre à plus de 750 millions d'euros. De plus, la présence de certaines souches de *R. solanacearum* dans le sol entraîne la mise en quarantaine des parcelles cultivées (Elphinstone, 1996). Les connaissances et la description des souches de *R. solanacearum* ont largement progressé ces dernières années dans de nombreux domaines scientifiques et un récent système de

classification hiérarchique basé sur des analyses phylogénétiques (Fegan & Prior, 2005) propose de revisiter la diversité génétique chez *R. solanacearum* et résout les conflits de classification préexistants.

Afin de comprendre l'épidémiologie d'une maladie, il est nécessaire d'identifier les communautés bactériennes concernées, la structuration de ses populations et leur écologie afin de déterminer les dynamiques évolutives qui ont abouti à la diversité connue. Ainsi, la thèse que j'ai entreprise s'inscrit dans la compréhension de la diversité phénotypique et génotypique de *R. solanacearum* par une approche d'écologie moléculaire. À ce jour, nous ne savons toujours pas quels sont les déterminismes biologiques qui font de *R. solanacearum* un agent pathogène si bien adapté à la survie dans différents environnements. Les nombreux efforts de caractérisation, génomique ces dernières années, ont permis des avancées dans les domaines de l'expression des gènes et de comprendre les cascades régulatrices des facteurs de virulence (Garbeva, Van Veen, *et al.*, 2004; Hudson, 2008). Cependant, sans la caractérisation des traits phénotypiques, il ne sera pas possible de faire le lien entre le contenu en gène, leur expression et l'épidémiologie d'un organisme.

Ainsi, après une synthèse bibliographique (chapitre 1) qui traite des principaux aspects de la diversité phénotypique, phylogénétique et génétique de *R. solanacearum*, je présenterai les objectifs affichés dans mes travaux de thèse. Ces travaux s'attachent dans un premier temps à revisiter la diversité génétique et phénotypique de *R. solanacearum* en portant une attention particulière aux souches adaptées au froid qui provoquent le flétrissement sur pomme de terre (chapitre 2). Ceci permettra en parallèle de dresser un bilan de la diversité dans la phylogénie des souches présentes en Europe et dans le bassin méditerranéen et les risques associés. Dans un second temps, la production de données de séquences de génomes complets de souches représentatives du complexe d'espèces a permis de dresser un bilan du pangénome de cet agent pathogène et d'en faire l'analyse en génomique comparative (chapitre 3). Ces données permettront de mieux comprendre la dynamique du génome associée au passé évolutif de *R. solanacearum* (chapitre 4) et surtout d'établir des bases solides pour développer nos approches postgénomiques chez cet organisme modèle, par une stratégie utilisant les puces à ADN (chapitre 5). *In fine*, les données épidémiologiques confrontées aux données pangénomiques devront permettre d'orienter les recherches de marqueurs moléculaires spécifiques des écotypes et de mieux comprendre le passé évolutif de *R. solanacearum*.

CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE *RALSTONIA* *SOLANACEARUM* ET LE FLETRISSEMENT BACTERIEN

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

RALSTONIA SOLANACEARUM ET LE FLETRISSEMENT BACTÉRIEN

R. solanacearum est un organisme modèle pour l'étude des bactéries phytopathogènes vasculaires d'origines telluriques. Cette espèce forme en réalité un complexe d'espèces dont les souches présentent une distribution mondiale (tropicale, intertropicale) et provoquent un flétrissement sur plus de 200 espèces hôtes réparties dans plus de 50 familles botaniques (Hayward, 1994a). La gamme d'hôtes inhabituellement étendue, sa constante évolution (Denny, 2006; Hayward, 1991), ainsi que les risques économiques encourus aux productions agricoles ont placé certaines souches de cet agent pathogène dans la liste des organismes de quarantaine en Europe ("Protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community," 2000) et comme agent de bioterrorisme aux États-Unis (Lambert, 2002). Récemment, *R. solanacearum* a été placé sur la liste des biens à double usage ; le contrôle des exportations des biens et technologies à double usage est un outil pour lutter contre la dissémination des armes conventionnelles et la prolifération des armes de destruction massive ("Community regime for the control of exports, transfer, brokering and transit of dual-use items," 2009), ce sont des produits susceptibles d'avoir une utilisation tant civile que militaire. La distribution de cet agent pathogène au niveau mondial et sa capacité à infecter de multiples hôtes suggèrent l'existence d'une spéciation corrélée à son développement dans les différentes zones géographiques et aux hôtes. Le passé évolutif des différents groupes de souches de *R. solanacearum* fait l'objet de nombreux travaux, (Coenye & Vandamme, 2003; Genin & Boucher, 2004; Guidot, Prior, *et al.*, 2007; Remenant, Coupat-Goutaland, *et al.*, 2010; Salanoubat, Genin, *et al.*, 2002) mais de très nombreuses questions restent en suspens. Ainsi, des processus de spéciation naturelle seraient associés à des phénomènes d'isolement géographique (Cook, Barlow, *et al.*, 1989), ajoutés à des contraintes environnementales de sélection exercées sur ces populations (Cohan, 2001). Cet organisme présente une architecture mosaïque du génome qui est organisé en deux réplicons : le chromosome et le mégaplasme. De plus, *R. solanacearum* est naturellement compétente pour la transformation de l'ADN par un processus de transferts horizontaux de gènes, ce qui lui permet de se décharger ou d'accéder rapidement à de nouvelles informations génétiques exogènes (Bertolla & Simonet, 1999; Bertolla, Van Gijsegem, *et al.*, 1997; Coupat, Chaumeille-Dole, *et al.*, 2008; Guidot, Coupat, *et al.*, 2009). L'ensemble de ces propriétés adaptatives a certainement permis une évolution rapide du génome de

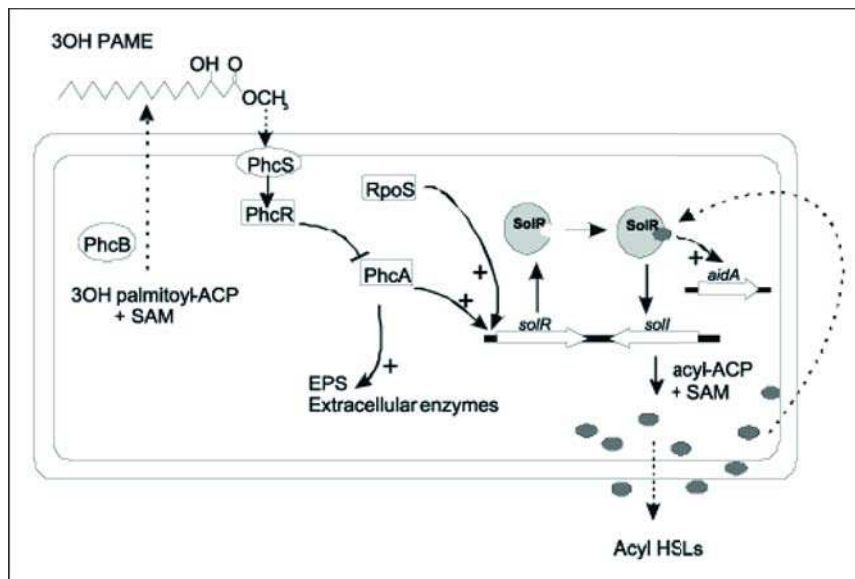


Figure 1. Quorum sensing chez *Ralstonia solanacearum*

Figure issue du travail de Whitehead et coll. (2001). Régulation de pathogénie et de la production d'acyl homosérine lactone (HSL) par une nouvelle molécule. Pour une densité faible de cellule, la concentration de 3-Hydroxypalmitic acid methyl ester (3OH PAME) est faible, et la protéine PhcS phosphoryle PhcR ; cette dernière régule négativement le facteur de régulation de transcription PhcA. Lors d'une augmentation de la densité cellulaire, 3OH PAME dépasse la concentration critique et réduit l'activité « kinase » de PhcS. Ceci induit la déphosphorylation de PhcR qui stoppe la régulation négative sur PhcA. La conséquence est l'augmentation des produits des gènes régulés par PhcA, comme les enzymes extracellulaire et l'exopolysaccharide (EPS). PhcA régule aussi un système de quorum sensing (*solI/solR*) qui régule l'expression de *aidA*, de fonction inconnue.



Figure 2. Culture de *Ralstonia solanacearum* sur milieu gélosé Kelman

2 Quorum-sensing et conversion phénotypique

Dans un environnement aussi complexe que celui dans lequel une bactérie évolue, de nombreux stimuli peuvent affecter son développement : pH, osmolarité, température, présence de nutriments... Les bactéries ont su développer des systèmes en réponse à ces stimuli, allant jusqu'à changer leurs profils d'expression de leur génome (Clough, Lee, *et al.*, 1997; Huang, Denny, *et al.*, 1993; Huang & Schell, 1992; Van der Zwet & Keil, 1979; Vojnov, do Amaral, *et al.*, 2010; Wosten, 1998; Yang, Crowley, *et al.*, 2001). Cette sensibilité à recevoir et à répondre aux signaux externes dans leur environnement, s'étend à la capacité de communiquer avec les communautés microbiennes avoisinantes, par le biais de molécules signales. La plupart de ces molécules ont été décrites comme faisant partie d'un système de régulation communément appelé « quorum-sensing » (Zhou, Xia, *et al.*, 2002). L'effectivité de la signalisation réside dans la concentration extracellulaire de ces molécules de faibles masses, précisément liée à une densité de population bactérienne. En atteignant une concentration critique, ces molécules induiront une nouvelle phase physiologique pour les cellules concernées. Chez *R. solanacearum*, il existe de nombreux exemples de régulation par quorum-sensing, comme pour l'expression du régulateur transcriptionnel PhcA (Brumbley, Carney, *et al.*, 1993) (Figure 1) qui coordonne de nombreux facteurs de virulence (Huang, Carney, *et al.*, 1995). Le niveau de PhcA actif est directement corrélé avec la densité de population bactérienne (Flavier, Clough, *et al.*, 1997). Par ailleurs, plus de 50 ans auparavant, avant même que les systèmes de quorum-sensing ne soient décrits chez *R. solanacearum*, il a été rapporté que des variants spontanés de *R. solanacearum* présentaient un changement de morphotype au niveau des colonies (Kelman, 1954) ; le morphotype de ces variants passant sur un milieu de culture solide d'un aspect fluide et muqueux (smooth) (Figure 2), à un aspect sec et rugueux (rough). Cette conversion phénotypique est corrélée avec la perte du pouvoir pathogène, c'est-à-dire la capacité du variant à causer tout symptôme de flétrissement chez un hôte sensible (Denny, Brumbley, *et al.*, 1994). L'apparition de ces variants phénotypiques est spontanée dès que la densité de cellules atteint une forte densité critique, en relation avec un système de régulation de quorum-sensing précédemment décrit. Des études montrent que la spontanéité de la transformation d'une souche sauvage en variant phénotypique serait due à des insertions aléatoires de matériel génétique dans le locus *phcA*, inhibant ainsi son expression (Brumbley, Carney, *et al.*, 1993; Jeong & Timmis, 2000). Pour les allèles de ce locus, *phcA1* a été désactivé par l'insertion d'un fragment de 2 pb, induisant un décalage dans le cadre de lecture et ainsi une troncature de la protéine exprimée. L'analyse de séquence révèle qu'un gène situé sur le locus *phcA* produit un composé qui est clairement identifié comme faisant

partie de la famille des activateurs de transcription LysR (Henikoff, Haughn, *et al.*, 1988). La famille LysR est l'une des plus larges dans la régulation des procaryotes et ses membres sont responsables de nombreux phénomènes cellulaires, apparemment non liés entre eux. PhcA a été associée à cette famille de par son homologie en N-terminal et son activation par une molécule externe. La restauration de la virulence se fait par la levée d'inhibition ou l'insertion de la séquence contenant *phcA* dans la bactérie affectée, suggérant la nécessité pour la bactérie de l'expression de *phcA* pour le maintien de la virulence (*i.e.* production d'endopolygalacturonase et d'endoglucanase...). En complément, des travaux sur tomate ont révélé que la restauration se fait aussi en contact d'exsudats de racines de la plante hôte (Poussier, Thoquet, *et al.*, 2003), impliquant l'hôte dans l'expression des systèmes de virulence de *R. solanacearum*.

Récemment, des études ont montré que *R. solanacearum* était également capable de transiter vers un état physiologique dit viable, mais non cultivable (VNC). Ceci peut être induit après exposition à des ions cuivres, lors de chocs thermiques à des températures de 4°C ou en présence d'un sol autoclavé (Caruso, Palomo, *et al.*, 2005; Grey & Steck, 2001; van Elsas, van Overbeek, & Trigalet, 2005). La suppression de ces stress induisant l'état VNC ne suffit cependant pas à la restauration de l'état viable et cultivable des cellules (Grey & Steck, 2001). Une fois entrées en stade VNC, les cellules sont métaboliquement actives et produisent de l'ATP et de l'ARN, mais ne sont pas visibles à la surface des milieux artificiels de laboratoire. Elles sont néanmoins capables de croissance du fait de la présence intacte de la membrane cytoplasmique et de l'élargissement du diamètre cellulaire en réponse à une source de nutriments (van Elsas, van Overbeek, & Trigalet, 2005). La fraction de cellules en état VNC se discerne des cellules mortes par comptage direct après coloration au 5-cyano-2,3-ditolyl chlorure de tétrazolium (van Elsas, Kastelein, *et al.*, 2001). L'état VNC, qui peut être considéré comme un mécanisme de survie à long terme pour les bactéries non sporulantes (Grey & Steck, 2001), n'est pas synonyme d'avirulence puisqu'elles sont capables d'infecter et de se multiplier dans les tissus de plante. Ceci pourrait expliquer la persistance de *R. solanacearum* dans la nature.

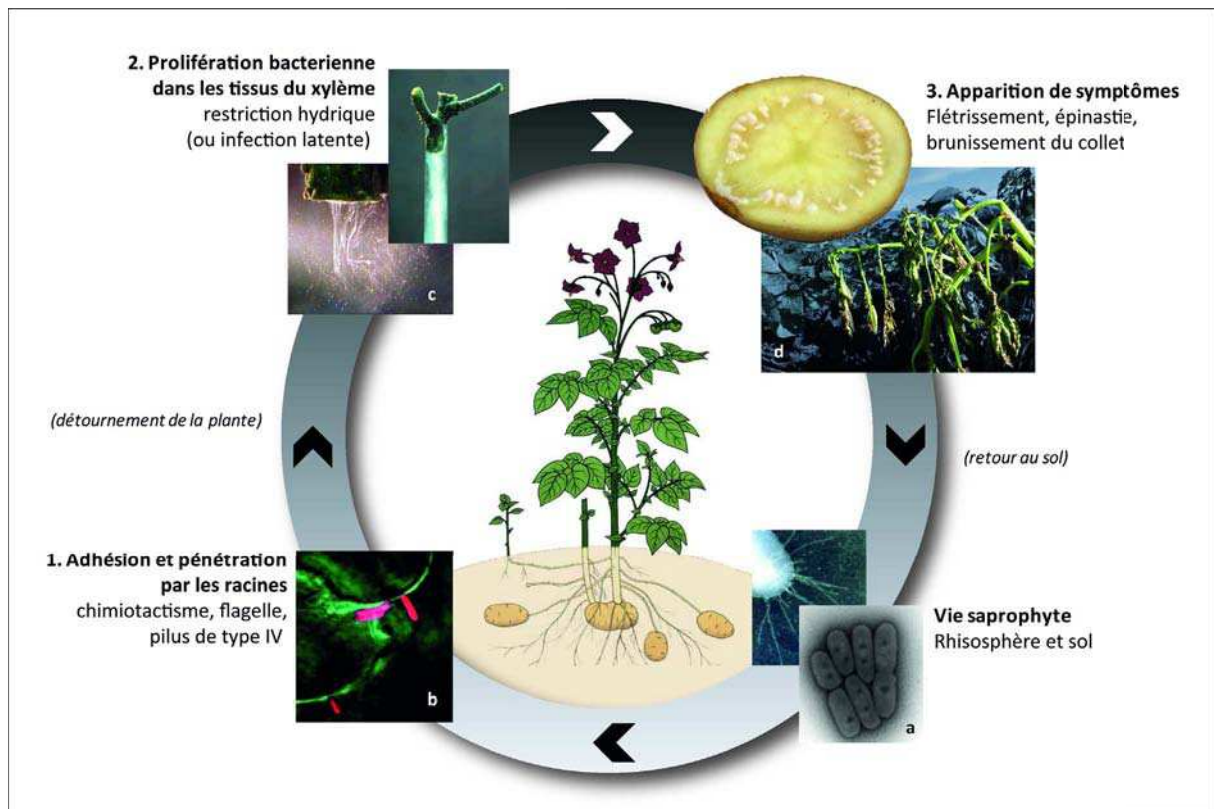


Figure 3. Cycle infectieux de *Ralstonia solanacearum*

Exemple du cycle infectieux de *R. solanacearum* sur pomme de terre (*Solanum tuberosum*) ; le cycle est similaire pour les autres plantes, sauf pour les bananiers (*Musa spp*) pour lesquels la contamination peut se faire aussi par la fleur mâle. **a.** observation de microscopie de *R. solanacearum* ; **b.** microscopie confocale de l'adhésion d'une souche de *R. solanacearum* marqué à l'aide d'un reporter *gfp* fusion ; **c.** test de l'eau montrant la production massive d'exopolysaccharide par *R. solanacearum* dans les tissus infectés d'une plante. ; **d.** exsudation d'exopolysaccharides par l'anneau vasculaire d'un tubercule de pomme de terre (haut), et plant de pomme de terre flétri dans un champ (bas). *Crédits photos : D. Aldon ; C. Allen ; C. Boucher ; G. Cellier ; P. Champoiseau ; D.B. Langston ; CIP ; Université de Géorgie.*

3 Mécanismes d'invasion de l'hôte

R. solanacearum est un organisme parfaitement compétitif et adapté à la survie. Dans l'environnement racinaire de certaines espèces, la bactérie peut alors pénétrer dans les tissus de l'hôte (Schmit, 1978), étapes universellement conservées chez toutes ces souches et siège de la mise en place des mécanismes du pouvoir pathogène. La colonisation de l'hôte se déroule en trois phases (Figure 3). Dans un premier temps, les racines sont les premières portes d'entrée de l'agent pathogène dont les tissus internes sont mis à jour par des facteurs naturels, comme la croissance des racines secondaire, des blessures occasionnées par des nématodes, des éléments tranchants dans le sol... ou par des facteurs entropiques, comme le travail mécanique du sol. Cette pénétration est permise par trois systèmes en amont : le chimiotactisme pour les exsudats racinaires (Yao & Allen, 2006), la mobilité, permise par les flagelles (Tans-Kersten, Brown, *et al.*, 2004; Tans-Kersten, Huang, *et al.*, 2001) et l'adhérence aux cellules hôte (Kang, Liu, *et al.*, 2002). Par la suite, la pénétration dans l'endoderme demande, chez la tomate, de 2 à 6 jours (Schmit, 1978; Vasse, Danoun, *et al.*, 2005; Vasse, Frey, *et al.*, 1995). La colonisation prend lieu d'abord dans l'espace intercellulaire du cylindre central et du parenchyme vasculaire, pour finalement atteindre les vaisseaux du xylème (Vasse, Frey, *et al.*, 1995). Les premiers symptômes de flétrissement apparaissent lorsque la population dénombrée en milieu de tige est supérieure à 10^7 cfu/g de tissu frais (McGarvey, Denny, *et al.*, 1999), alors que la concentration en exopolysaccharides, composé principal du mucus chez *R. solanacearum* et facteur secondaire du pouvoir pathogène, équivaut à 10 µg/g de tissus (Denny & Baek, 1991; McGarvey, Denny, *et al.*, 1999). Ces comportements physiologiques de *R. solanacearum* provoquent une occlusion du xylème et donc une restriction hydrique de la plante (Buddenhagen & Kelman, 1964; Denny, Carney, *et al.*, 1990). Une autre théorie présente ce mécanisme sous un autre angle : celui de la production de toxines par *R. solanacearum* dans la plante qui conduit à une transpiration accrue en agissant sur le fonctionnement des stomates. Mais des études ont montré que la première hypothèse semblait être la plus plausible tant l'augmentation de la consommation en eau n'était pas corrélée avec l'apparition des symptômes du flétrissement (Buddenhagen & Kelman, 1964; Denny, Carney, *et al.*, 1990; Van Alfen, 1989).

La capacité de *R. solanacearum* à s'adapter aux pressions environnementales permet de comprendre son maintien au niveau mondial à l'état endémique dans de nombreux types de sols, climat, couverts végétaux... Connues pour être adaptées à des environnements tropicaux chauds, certaines souches de *R. solanacearum* sont aussi capables d'exprimer de la virulence à des températures froides ; températures que l'on retrouve en altitude ou encore dans les régions tempérées d'Europe. Les mécanismes de pathogénie dans ces conditions de températures froides sont encore mal documentés et ne sont probablement pas retrouvés

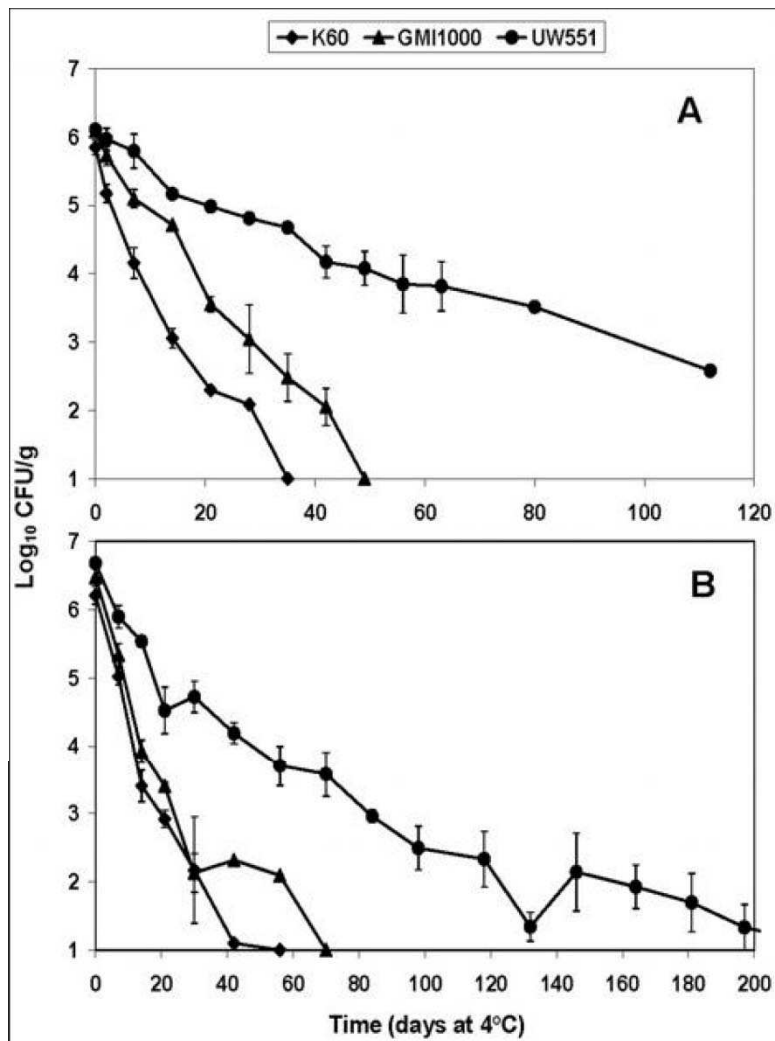


Figure 4. Survie de *Ralstonia solanacearum* dans des tubercules de pomme de terre à température froide

Figure issue des recherches de Milling et coll. (2009) montrant la cinétique de survie des souches UW551 (IIB-1), GMI1000 (I-18), et K60 (IIA-7), inoculées dans des tubercules de pomme de terre (A) cv Russet Norkotah et (B) cv Shepody. Les tubercules ont été infectés par *R. solanacearum* à une concentration de $1 \text{ à } 2 \times 10^{-6}$ cfu/tubercule à une température de 4°C.

dans toutes les divisions de la phylogénie du complexe d'espèces. Seules les souches de phylotype III africaines décrites sur les hauts plateaux au Cameroun (Mahbou Somo Toukam, Cellier, *et al.*, 2009) et les souches Brown rot de phylotype IIB sequevar 1 sont renseignées comme tolérantes au froid (Figure 4) (Cellier & Prior, 2010; Elphinstone, 1996; Milling, Meng, *et al.*, 2009).

4 Diagnostic

La détection et l'identification d'organismes bactériens sont des problématiques complémentaires et interdépendantes. Si l'industrie pharmaceutique soutient largement la mise au point de méthodes et autres kits de diagnostic pour les germes cliniques relatifs à la santé publique, l'intérêt pour les risques associés à l'introduction ou au développement épidémique de phyto bactérioses a mis plus de temps à émerger dans le domaine de l'agriculture.

Une liste d'organismes placés sous quarantaine est dressée sous le contrôle de l'Union européenne ("Protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community," 2000) en collaboration avec l'Organisation Européenne et méditerranéenne de Protection des Plantes (OEPP). La même politique est adoptée aux États-Unis (Lambert, 2002) où *R. solanacearum* est désigné comme organisme de quarantaine et agent de bioterrorisme (Bioterrorism Select Agent, BSA et organisme à double usage). De larges efforts ont donc été consentis dans la recherche de lots contaminés par ces bactéries de quarantaines. Toute méthode de détection ou d'identification est régie par cinq points bien précis : (i) ces méthodes doivent donner lieu à une description suffisamment exhaustive pour caractériser l'agent pathogène détecté dans un échantillon donné ; (ii) Aucune de ces méthodes ne peut prétendre à une identification, une sensibilité, une rapidité et une spécificité équivalente pour tous les types d'échantillon : il faut qu'elle stipule ces propres limites ; (iii) Les protocoles utilisés en amont ont une influence sur la qualité des protocoles envisagés ; (iv) les quantités minimales d'échantillons nécessaires sont sensiblement différentes en fonction du protocole ; et (v) le coût de la méthode est important. La prise en compte de nombreux facteurs comme la disponibilité des produits, la maintenance des appareils scientifiques, les qualifications du personnel, ou encore le temps passé sur un protocole conditionne en grande partie le choix de la méthode.

R. solanacearum est un habitant du sol qui se maintient dans des espèces réservoirs : Douce-amère et autres mauvaises herbes (Alvarez, Vasse, *et al.*, 2008; Berg, 1971; Elphinstone, 1996; Pradhanang, Elphinstone, *et al.*, 2000a; Wenneker, Verdel, *et al.*, 1999). Dans le cas



Figure 5. Symptômes causés par *Ralstonia solanacearum* sur tubercules de pomme de terre

Coloration caractéristique brune de l'anneau vasculaire sur tubercule de pomme de terre (*S. tuberosum*) (gauche) et exsudation d'exopolysaccharides par le même anneau vasculaire. *Crédits photo : P. Champoiseau.*

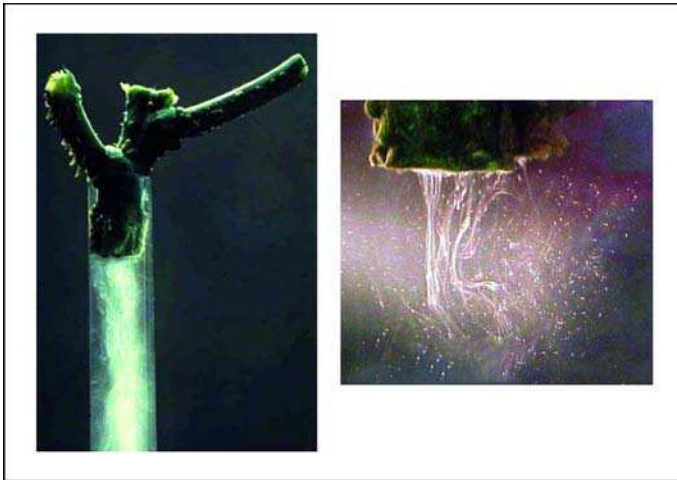


Figure 6. « Test de l'eau »

Exsudation d'exopolysaccharides dans une solution d'eau ou de Tris provoquée par *Ralstonia solanacearum* lors de la colonisation des tissus d'un hôte végétal. *Crédits photos : Université de Géorgie.*

Les milieux spécifiques sont nécessaires pour un isolement semi-sélectif des souches de *R. solanacearum*. Un des composés utilisés par Kelman est le chlorure de tétrazolium (Kelman, 1954). Les sels de tétrazolium sont connus depuis plus la fin du XIXe, mais ce n'est qu'en 1939 que leur utilité biologique a été mise à jour pour tester la viabilité des graines. Facilement réduit en composés solubles incolores ou en pigments insolubles de formazan, le tétrazolium est utile pour déterminer l'activité des déshydrogénases. Premièrement pour ces raisons, ces composés ont trouvé des applications dans l'étude des domaines de la microbiologie, des tissus animaux et végétaux. En employant le tétrazolium dans un milieu de culture bactérienne, on peut apprécier quantitativement l'activité oxydoréductrice des composés sécrétés par la souche concernée. Les composés azotés de structure générale $RNH-N==CR'-N==NR$ permettent de détecter les souches muqueuses de *R. solanacearum* par la formation d'un pigment diffus rouge pâle à rose au centre de la colonie. Le milieu contient 0,25 – 1,00% de dextrose, 1‰ de peptone, 1% de casamino acides et 1,5% d'agar suspendus dans de l'eau distillée, à laquelle une solution de 2,3,5 triphényl chloro-tétrazolium est ajoutée

Les méthodes actuelles de détection de *R. solanacearum* sont basées sur des techniques de biologie moléculaire ou sérologique. Néanmoins, l'utilisation des plantes est une technique toujours appliquée dans l'identification de l'agent pathogène, que ce soit par indexage par la plante (Macho, Guidot, *et al.*, 2010), ou par le biais de plantes indicatrices (Graham & Lloyd, 1978; Hayward, 1991; Vaughan, 1944). Ces plantes indicatrices sont plantées directement dans la surface cultivée, aux abords ou en pot contenant le sol de la parcelle, elles sont susceptibles de donner des informations quant à l'état sanitaire d'une grande surface de sol et de prévenir une infestation de *R. solanacearum*. Mais il y a cependant quelques désavantages à cette technique : (i) très laborieuse à mettre en place, elle nécessite de nombreux sites sur la parcelle ou une surface de serre importante avec des conditions climatiques précises ; (ii) les agents pathogènes dont la virulence est faible, voire inexistante, sur les plantes indicatrices passent alors inaperçus. Cela implique des vérifications supplémentaires sur d'autres plantes indicatrices et multiplie ainsi les traitements d'échantillonnage ; (iii) ces mêmes plantes indicatrices peuvent être sensibles à d'autres agents pathogènes et représenter des « faux positifs » ; et (iv) les résultats peuvent ne pas être disponibles avant plusieurs semaines après l'inoculation.

4.1 La sérologie

Généralement rapides, les tests sérologiques sont habituellement utilisés dans une première phase de tests pour la détection des agents pathogènes. Leurs seuils de détection varient en fonction de la méthode utilisée, mais se situent entre 10^3 - 10^4 bactéries/ml, (Black, Seal, *et al.*, 1996; Dittapongpitch & Surat, 2003; Seal & Elphinstone, 1994) et présentent des inconvénients au niveau de leur spécificité et de leur sensibilité. Ainsi, il est obtenu une meilleure sensibilité pour la détection de *R. solanacearum* avec un antisérum polyclonal que par anticorps monoclonaux, aux prix d'une réduction de la spécificité (Griep, van Twisk, *et al.*, 1998). Les tests sérologiques sont incapables de différencier les cellules vivantes des cellules mortes. Ce critère peut s'avérer important dans le cadre de bactéries de quarantaine pour lesquelles les lots contaminés seront soit écartés, soit détruits. Actuellement, plusieurs kits sérologiques sont disponibles sur le marché et proposent une identification rapide en quelques minutes. Les tests ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) sont toujours très utilisés dans les laboratoires (Elphinstone & Stanford, 1998; Elphinstone, Stead, *et al.*, 2000; Janse, 1988) du fait de leurs flexibilités et de leurs rapidités pour traiter un grand nombre d'échantillons au meilleur coût. Ces tests tolèrent la présence de matières exogènes à l'organisme en cours d'identification, comme des extraits de sol ou de plantes. Ils possèdent néanmoins un seuil de détection assez haut puisque les méthodes utilisant l'antisérum polyclonal détectent des populations de l'ordre d'environ 10^4 bactéries/ml et les méthodes utilisant les anticorps monoclonaux d'environ 10^6 bactéries/ml (Llop, Caruso, *et al.*, 1999; Pradhanang, Elphinstone, *et al.*, 2000b). Ces seuils de sensibilité peuvent être améliorés en enrichissant au préalable l'échantillon dans un bouillon de culture classique ou semi-sélectif (Elphinstone, 1996; Pradhanang, Elphinstone, *et al.*, 2000b). Des alternatives comparables aux tests ELISA sont l'IFAS (immunofluorescence-antibody staining) (Elphinstone & Stanford, 1998; Elphinstone, Stead, *et al.*, 2000; Janse, 1988) et l'IFCS (immunofluorescence-colony staining) (Elphinstone, 1996; Janse, 1988; van der Wolf, Vriend, *et al.*, 2000) dont les seuils de détections sont environ de 10^2 à 10^4 bactéries/g de sol ou /ml d'extrait de tissu ; elles requièrent néanmoins un matériel basé sur des microscopes spécialisés qui peuvent s'avérer onéreux.

4.2 Les technologies de l'ADN

Les méthodes basées sur des protocoles utilisant directement l'ADN exploitent le principe de l'hybridation complémentaire de sonde ou d'amorces PCR sur la (les) séquence(s) cible(s) spécifique(s) de l'organisme pathogène à diagnostiquer. La méthode FISH (Fuorescent *in situ* hybridization) est l'une des rares à encore utiliser des amorces marquées (Wullings, Van Beuningen, *et al.*, 1998), mais possède une plus forte sensibilité. Les méthodes plus

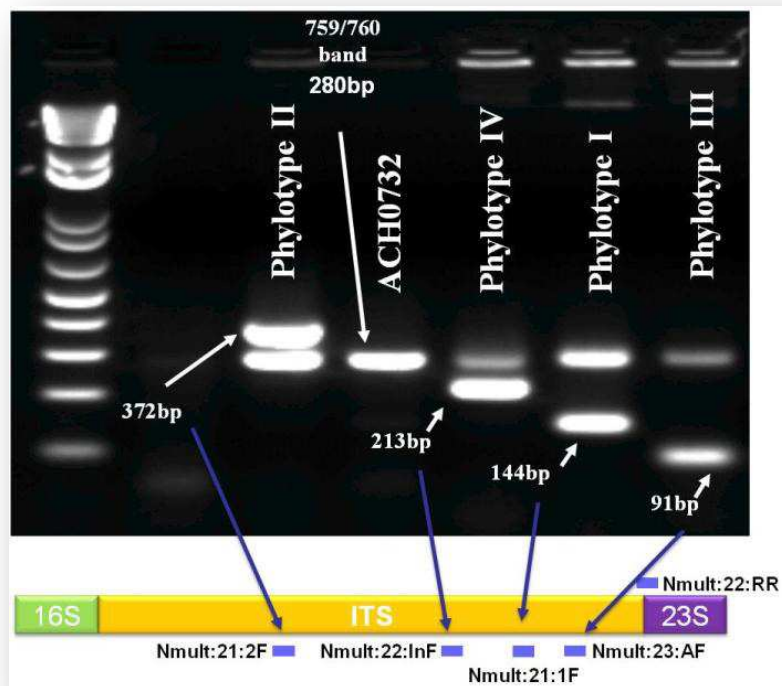


Figure 7. Gel d'électrophorèse de la PCR multiplexe sur *Ralstonia solanacearum*

Gel d'électrophorèse montrant la révélation de la PCR multiplexe développée par Fegan et Prior (2005) basée sur la classification en phylotypes. La bande de 280 pb indiquent l'appartenance de l'organisme au genre *Ralstonia* et à l'espèce *solanacearum*. Les bandes à 144 pb, 372 pb, 91 pb et 213 pb indiquent respectivement l'appartenance aux phylotypes I, II, III et IV. La localisation des zones d'amplification pour chaque couple d'amorce est indiquée sur le schéma en dessous du gel d'électrophorèse.

classiques par PCR se résument à la PCR directe (Hartung, Werner, *et al.*, 1998), multiplexe (Fegan & Prior, 2005; Weller, Elphinstone, Smith, Boonham, *et al.*, 2000), nested-PCR (Poussier & Luisetti, 2000), cooperational-PCR (Caruso, Bertolini, *et al.*, 2003) et real-time PCR (Kutin, Alvarez, *et al.*, 2009; Ozakman & Schaad, 2003; Ozakman & Schaad, 2002). Afin de minimiser les faux positifs, ces techniques nécessitent une préparation sans aucune source de contamination, que l'on peut trouver dans des extraits de sol ou de plantes. Le dessin des amorces ou des sondes est essentiel pour assurer la spécificité, la robustesse et la portabilité des résultats. Tout comme les méthodes sérologiques, les méthodes basées sur l'ADN détectent aussi bien l'ADN des cellules vivantes que mortes, du fait de la conservation de l'ADN après la mort cellulaire. Néanmoins, les débris cellulaires de l'hôte ou la présence d'autres composés dans le milieu réactionnel peuvent inhiber les réactions de PCR et donner lieu à des faux négatifs. Ainsi, il est avéré que les extraits de pomme de terre induisent un des blocages dans les réactions de PCR (Elphinstone, 1996; Llop, Caruso, *et al.*, 1999; Weller, Elphinstone, Smith, & Stead, 2000). Ces inhibiteurs de PCR, pour la plupart non identifiés, peuvent se retrouver dans les différentes parties de la plante, y compris la graine, le sol, ou encore l'eau. De fait, cette méthode donnera les meilleurs résultats en extrayant l'ADN de l'échantillon ou, dans le cas échéant, en ajoutant un adjuvant au milieu réactionnel ; en particulier le PVP (polyvinyl pyrrolidone) ou le PVPP (polyvinyl polypyrrolidone) (Ozakman & Schaad, 2003; Poussier, Cheron, *et al.*, 2002). L'addition de sérum d'albumine bovin (BSA), le diméthylsulfoxyde (DMSO), ou de tréhalose peut aider à augmenter les chances de réussite de la PCR (Poussier, Cheron, *et al.*, 2002; Seal, 1998) ; la culture de l'échantillon sur milieu SMSA (Elphinstone, 1996; Pradhanang, Elphinstone, *et al.*, 2000b; Seal, 1998; Weller, Elphinstone, Smith, & Stead, 2000), liquide ou solide, permet d'enrichir la population de *R. solanacearum* avant d'entreprendre une PCR. Un protocole de PCR Multiplexe développé par Fegan et Prior (2005) permet de diagnostiquer les différents phylotypes (Figure 7) et d'autres PCR permettent la détection de *R. solanacearum* (Glick, Coffey, *et al.*, 2002; Kubota, Vine, *et al.*, 2008; Lee & Wang, 2000; Opina, Tavner, *et al.*, 1997; Schönfeld, Heuer, *et al.*, 2003; Seal, Jackson, *et al.*, 1993; Seal, Taghavi, *et al.*, 1999; Wullings, Van Beuningen, *et al.*, 1998).

La technologie basée sur les puces à ADN permet aussi de diagnostiquer des agents pathogènes. Elles peuvent être utilisées en routine pour détecter un ou plusieurs agents pathogènes (Aittamaa, Somervuo, *et al.*, 2008) ou couplées avec des techniques de PCR (Call, Borucki, *et al.*, 2003). Les puces à ADN sont composées de multiples sondes, allant jusqu'à 2 millions, sur un support solide ; le plus courant étant le verre. Chaque sonde possède une séquence complémentaire d'un fragment d'ADN cible d'intérêt, dont la présence dans l'organisme sera révélée par une fluorescence. Il a par ailleurs été montré que

Tableau 1. Comparaison de la sensibilité des méthodes de détection de *Ralstonia solanacearum*

| Méthode de Détection | Concentration | Références |
|----------------------|---|--|
| | bactérienne minimale détectée (cfu/mL) | |
| Tests sur plantes | $10^3 - 10^4$ | (Janse, 1988) |
| Plantes indicatrices | $10^2 - 10^4$ | (Janse, 1988) |
| Test ELISA | 10^4 | (Robinson, 1993) |
| Anticorps | 10^4 | (Wullings, Van Beuningen, |
| Immunofluorescence | | <i>et al.</i> , 1998) |
| Sonde ADN | $10^5 - 10^6$ | (Cook & Sequeira, 1991) |
| PCR et puces à ADN | 5 - 116 | (Kane, Jatkoa, <i>et al.</i> , 2000; Seal, Jackson, <i>et al.</i> , 1992) |

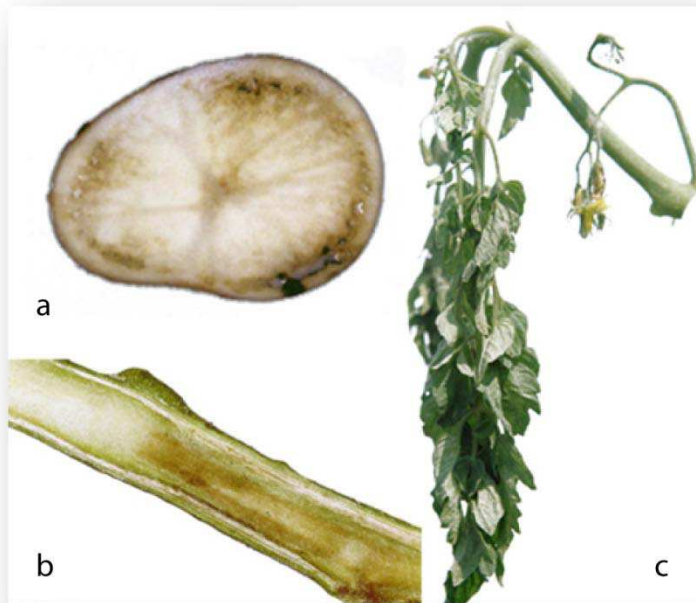


Figure 8. Symptômes caractéristiques provoqués par *Ralstonia solanacearum* sur *Solanaceae*

a. Brunissement du tubercule pour la pomme de terre ; **b.** brunissement de la tige ; **c.** épinastie et flétrissement général de la plante. *Crédits photos : Clemson University ; K. Tsuchiya.*

1996; Janse, 1996; Pradhanang, Elphinstone, *et al.*, 2000a). L'eau contaminée donnera lieu à une contamination au champ si elle est utilisée en irrigation (Elphinstone, 1996; Janse, 1996). Les symptômes associés aux flétrissements bactériens causés par *R. solanacearum* sont dus à une déficience hydrique de la plante. Ainsi, il est typiquement observable un brunissement du xylème, une épínastie, une nécrose de tout ou partie de la feuille et enfin, un flétrissement généralisé de la plante (Figure 8). Au cours de l'infection, un arrêt de la croissance peut intervenir et une coloration brune est visible à l'intérieur de la tige. Le flétrissement est généralement observé à température tropicale chaude. Cependant, la diversité du complexe d'espèces *R. solanacearum* est telle, que de nombreuses souches se sont adaptées à des hôtes précis, réduisant ainsi leurs gammes d'hôtes. Cette spécialisation amène donc à des comportements différents en fonction de l'hôte infecté.

5.1 Les plantes hôtes

5.1.1 Pomme de terre (Brown rot)

Lorsqu'il se développe sur la pomme de terre (*S. tuberosum*), le flétrissement bactérien est appelé pourriture brune ou « potato Brown rot » et il est causé par les souches de phylotype IIB sequevar 1 (IIB-1) et sequevar 2 (IIB-2). Cependant d'autres souches assignées dans d'autres phylotypes sont également capables d'infecter la pomme de terre. Les symptômes sont visibles dans le tubercule lors du développement de la plante (Allen, Kelman, *et al.*, 2001) et une section longitudinale révèle une décoloration grise à brune du tissu vasculaire. Dans les cas avancés, cette décoloration se développe aussi au cœur du tubercule et un exsudat blanchâtre caractéristique apparaît, composé de bactéries et d'exopolysaccharides (voir Figures 5 et 8). La tige aérienne peut devenir tachetée de brun du fait de la décoloration des tissus vasculaires et de leurs nécroses. Les symptômes de jaunissement et l'arrêt de la croissance peuvent être observés avant tout flétrissement et les plants d'apparences sains peuvent être infectés à l'état latent. Les souches présentes dans le matériel infecté de façon latente peuvent donner lieu à la dispersion de *R. solanacearum* dans le milieu et infecter à leur tour de façon latente des hôtes alternatifs comme *S. dulcarama* (Elphinstone, 1998; Elphinstone, 2005).

La particularité des souches Brown rot de phylotype IIB-1 réside dans le fait qu'elles sont capables de produire un flétrissement à températures froides (< 24°C) (Allen, Kelman, *et al.*, 2001; Cellier & Prior, 2010; French, 1986, 1994; Lemaga, Kakuhenzire, *et al.*, 2005; Milling, Meng, *et al.*, 2009; Swanson, Yao, *et al.*, 2005). Il a néanmoins été montré que ces souches ne présentaient pas d'adaptation particulière au froid dans l'eau où sa survie n'est pas meilleure que les souches de sequevar différent et sa croissance n'est pas meilleure non plus sur milieu de culture dans ces conditions (Milling, Meng, *et al.*, 2009). Cette tolérance au



Figure 9. Flétrissement causé par *Ralstonia solanacearum* sur tomate

Flétrissements observé sur tomate (*Solanum lycopersicum*) (à droite) par rapport aux témoins sains (à gauche).



Figure 10. Flétrissement causé par *Ralstonia solanacearum* sur géranium

froid ne serait observée chez les souches Brown rot IIB-1 que *in planta*. Les tissus de la plante déclencheraient des mécanismes lui conférant des possibilités de survie et de virulence à ses basses températures (voir Figure 4) ; les souches d'autres sequevars présentant un taux de survie réduit et une dépression de virulence (Cellier & Prior, 2010; Milling, Meng, *et al.*, 2009). Ces conditions peuvent être rencontrées en milieu tropical sur les hauts plateaux andins ou africains (Mahbou Somo Toukam, Cellier, *et al.*, 2009), mais aussi en climat tempéré, comme en Europe ou aux États-Unis.

5.1.2 Tomate et tabac

Les espèces de tomates (*S. lycopersicom* L.) sont souvent affectées par *R. solanacearum* du fait de leurs zones géographiques de culture très étendue. Les plus jeunes feuilles sont les premières à présenter un symptôme de flétrissement, les folioles s'enroulent et cela est parfois unilatéral, puis la feuille présente une épinastie. Les symptômes apparaissent généralement après le début de la floraison (McCarter, 1991), mais dans le cas de la présence d'un fort inoculum, les flétrissements interviennent massivement dans les deux semaines suivant la plantation. Ces symptômes (Figure 9) sont identiques quelle que soit la souche infectant les tissus de la tomate. Le flétrissement s'accélère en journée pour des températures de l'ordre de 28°C, et diminue la nuit quand les températures décroissent. Le flétrissement bactérien sur tabac (*Nicotiana tabacum*) est aussi connu sous le nom de maladie de Granville (Granville Wilt) aux États-Unis. Sous un climat humide et chaud, les symptômes sont similaires à ceux observés sur tomate, mais ici, une tendance unilatérale du flétrissement est observable (Echandi, 1991), accompagnée d'un éclaircissement de la couleur de la plante pour finalement présenter une teinte jaunâtre et un aspect nécrotique.

5.1.3 Ornementales

Sur géranium, ce flétrissement est appelé « Southern wilt » et débute par une chlorose des feuilles les plus anciennes et se précise par un aspect typique de nécrose sur la bordure des feuilles (Figure 10). Lors de l'évolution de la maladie, les feuilles plus jeunes sont touchées et la nécrose générale prend lieu. Dans les stades avancés, la tige se gélifie, se décolore pour devenir noire et finalement se nécroser. Il a été noté que les souches Brown rot étaient capables d'infecter cet hôte, ainsi que de très nombreuses ornementales : pothos, anthurium... en plus des souches de phylotype III (Janse, 1996; Williamson, Nakaho, *et al.*, 2002). Alors que les plants maintenus à température froide pendant plusieurs mois sont d'apparence saine (Swanson, Yao, *et al.*, 2005), la maladie s'exprimera dès le retour à une température comprise entre 29°C et 35°C.

Tableau 2. Description des différentes souches de *Ralstonia solanacearum* provoquant la maladie de Moko^a

| Type de souches | Distribution | Caractéristiques | Écologie | MLG ^b |
|-------------------------------|--|---|---|------------------|
| SFR (Small Fluidal and Round) | Amérique Centrale, Venezuela, Colombie, Caraïbes | Petite colonie fluide et ronde, petits pigments de formazan | Hautement pathogène, transmission par insecte privilégiée | 25, 28 |
| B (Banana rapid wilt) | Amérique Centrale et du Sud, Philippines | Colonie en ellipse large, petits pigments de formazan | Hautement pathogène, transmission par le sol privilégiée | 24 |
| D (Distorsion) | Costa Rica, Surinam, Guyane | Colonie en ellipse large, petits pigments de formazan | Faible pathogénie pour banane, plantain, Heliconia | 24, 25 |
| H | Costa Rica | Colonie en ellipse large, petits pigments de formazan | Pathogène des plantains, mais pas des bananes | 24 |

^a. Les souches sont décrites sur la base de leurs aspects phénotypique sur culture de laboratoire en milieu solide.

^b. MLG (MultiLocus Genotype) (Cook & Sequeira, 1994).



Figure 11. Flétrissement causé par l'écotype Moko de *Ralstonia solanacearum* sur banane
 Le flétrissement est visible sur la plante entière (gauche) par rapport à une plante saine.
 La tige suintante prend une coloration brune (droite) par rapport à une plante saine.

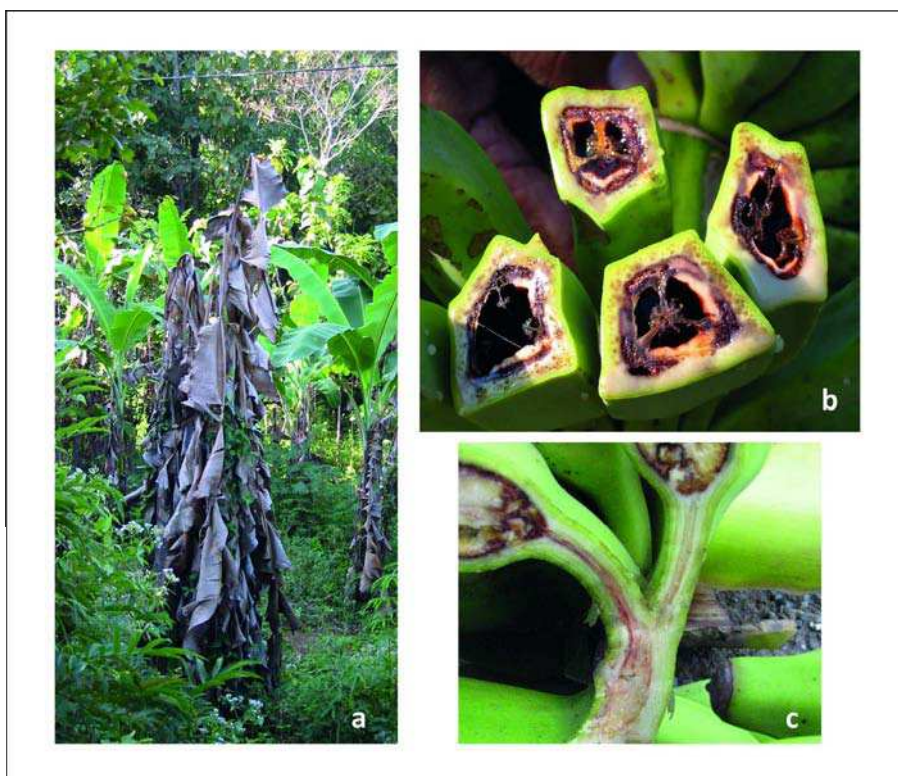


Figure 12. Maladie du sang du bananier causée par le Blood Disease Bacterium (BDB)

Le flétrissement prend sur la plante entière (a), puis une coloration caractéristique rouge est visible à l'intérieur des régimes de bananes (b) et s'étend dans les tissus vasculaires de la plantes (c).

contaminés noircissent et se rabougrissent au bout de deux à quatre semaines et on observe un flétrissement du cigare. Dans le cadre d'une transmission par un insecte vecteur, comme pour les souches Moko ou encore le Blood Disease Bacterium, l'infection se signale de manière caractéristique par l'apparition des premiers symptômes sur les fleurs et les fruits, bien avant que les feuilles ne commencent à flétrir. Un abondant exsudat bactérien suinte à partir des bourgeons de la fleur mâle qui noircit, mais les inflorescences restent attachées. Les fruits jaunissent de façon anormale, éclatent ou se crevassent et une coupe transversale laisse apparaître un intense brunissement vasculaire. Une pourriture sèche et grisâtre se développe dans la pulpe du fruit (Figure 11).

5.1.4.2 La maladie de Bugtok

Les symptômes de la maladie de Bugtok sont restreints aux fruits et à l'inflorescence mâles des bananiers, et le brunissement vasculaire des tissus ne s'étend que très rarement dans les parties inférieures du pseudotrunc (Thwaites, Eden-Green, *et al.*, 2000) ; la littérature ne rapporte d'ailleurs pas de contamination des rejets. Les symptômes caractéristiques de la maladie de Bugtok (ou maladie de « Tapurok ») se déclinent en un durcissement des fruits immatures, dont la section transversale montre une abondante pourriture sèche et gris-noir de la pulpe et une colonisation vasculaire intense du rachis, accompagnée d'un brunissement brun-rouge. Au stade avancé l'ensemble des fruits portés par le régime finit par jaunir prématurément.

5.1.4.3 La maladie du sang (Blood Disease Bacterium)

Les souches de Blood Disease Bacterium (BDB) sont inféodées aux *Musaceae*. Les symptômes sont très similaires à la maladie de la Moko par le jaunissement des feuilles, leurs flétrissements, suivi d'une nécrose et d'une déhiscence. Les tissus brunissent et un exsudat rougeâtre abondant apparaît dans les tissus vasculaires, d'où le nom de cette maladie (Figure 12). Les infections peuvent être d'origines telluriques et affectent également les rejets, ou d'origines aériennes et sont véhiculées par des insectes potentiellement vecteurs appartenant principalement aux familles : *Chloropidae* (diptère), *Drosophilidae* (diptère), *Platypezidae* (diptère), *Culicidae* (diptère), *Muscidae* (diptère), *Anthomyiidae* (diptère), *Sarcopangidae* (diptère), *Coleophoridae* (lépidoptère), *Blattidae* (blattoptère), et *Apidae* (hyménoptère) (Supriadi, 2005). Cependant, cette liste n'est pas exhaustive, car tout contact sur un plant infecté peut représenter un potentiel vecteur de cette maladie.

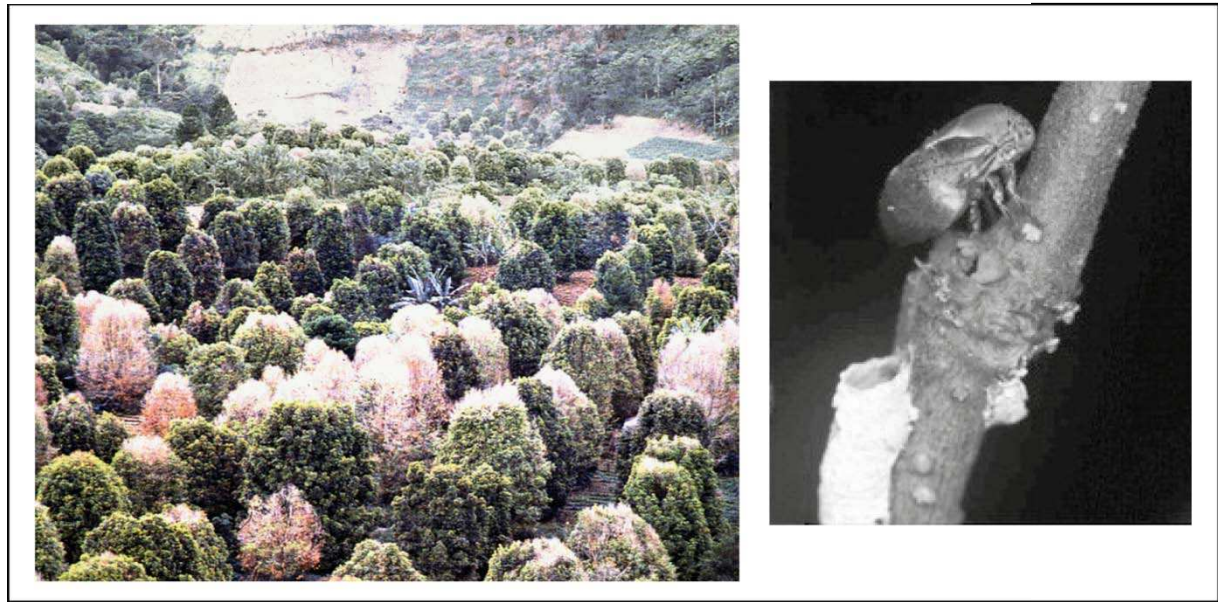


Figure 13. La maladie de Sumatra du giroflier (*Syzygium aromaticum* (L.)) causée par *Ralstonia syzygii* et son insecte vecteur (*Hindola* spp)

Les arbres touchés perdent leurs feuilles et semblent sécher sur place (à gauche). Le vecteur de cette maladie (à droite) appartient au genre *Hindola* (Homoptère : *Machaerotidae*).
Crédits photos : C. H. Dietric , C. Hayward.

R. solanacearum attaque donc des espèces hôtes d'importance agronomique, horticole et vivrière dans de nombreux pays émergents. L'impact ici est double, avec des aspects à la fois sociaux et économiques. Les plantes touchées sont détruites en seulement quelques semaines. La gamme d'hôtes étendue de certaines souches de *R. solanacearum* est le reflet d'une large base génétique, alors que les souches ayant une gamme d'hôtes restreinte sont le reflet d'une spécialisation d'adaptation à l'hôte. Les répertoires de gènes contrôlant ces caractéristiques de pathogénie sont encore mal décrits et de nombreuses interrogations subsistent quant aux mécanismes de spécificité d'hôte et de virulence.

6 Méthodes de lutte

Pour s'inscrire dans une logique de durabilité, une approche basée sur plusieurs méthodes de lutte semble être la meilleure stratégie pour réduire l'incidence ou la sévérité des attaques de *R. solanacearum* à l'échelle de la parcelle, de l'exploitation ou du territoire (Hartman & Elphinstone, 1994; Saddler, 2005). Les principales méthodes de lutte consistent à combiner de préférence l'utilisation de matériel végétal indemne de tout agent pathogène, si possible sélectionné pour développer un niveau acceptable de résistance, et de pratiquer des rotations culturales en alternant avec des espèces non hôtes de *R. solanacearum* (French, 1994; Lemaga, Kakuhenzire, *et al.*, 2005; Saddler, 2005). À une échelle globale, la propagation de *R. solanacearum* s'est majoritairement faite par diffusion de plants ou parties de plants asymptomatiques (infections latentes), mais la continuité des territoires est cependant limitée par les frontières politiques de pays et les différentes mesures de contrôles sanitaires tendent à limiter la propagation de ce type d'agent pathogène.

L'utilisation de variétés résistantes adaptées reste la meilleure alternative pour lutter contre un agent pathogène (Boshou, 2005), en particulier s'agissant des bactéries qui résistent à la plupart des produits chimiques autorisés sur le marché (la législation européenne interdit l'usage des antibiotiques depuis des décennies). Cela est particulièrement vrai lorsqu'il s'agit de contrôler un organisme cumulant ces propriétés : bactérie, tellurique ou rhizosphérique et vasculaire. À ce jour, toutes les résistances opposables au flétrissement bactérien sont rarement d'hérédité simple, et même dans le cas de résistance monogénique dominante au sens mendélien du terme, la génétique quantitative prouve que le caractère est gouverné par de nombreux QTLs à effets partiels ou majeurs (Thoquet, Oliver, *et al.*, 1996). Cette nature polygénique des sources de résistance complique les schémas de sélection et la complication est encore accentuée par la forte interaction plante-pathogène-environnement qui fait que la propriété de résistance s'exprime ou non. Concernant les cultures de solanées, la littérature converge vers la sélection de résistance adaptée localement (French, 1994; Hayward, 1991), mais aucune résistance de type universelle n'est encore mise à la

disposition par les généticiens et les sélectionneurs. Il existe néanmoins des variétés tolérantes produisant un rendement acceptable, mais possédant potentiellement au sein de leurs tissus la présence de l'organisme pathogène. Les résistances aux infections latentes sont une voie de recherche prometteuse et limiteraient la dispersion de *R. solanacearum* au plan du territoire. Hawaii7996, lignée utilisée dans nos expérimentations, est un bon exemple de lignée résistante (Wang, Olivier, *et al.*, 2000), mais n'offre pas satisfaction dans la qualité du fruit (Prior, Grimault, *et al.*, 1994; Wang, Hanson, *et al.*, 1998). Quel que soit le niveau de résistance variétale disponible à opposer à *R. solanacearum*, la résistance doit donc être épaulée par des séries de mesures appropriées. Parmi celles-ci, les pratiques culturales, qui sont définies comme un ensemble de techniques agronomiques servant un objectif particulier de production conduisant à l'élaboration d'un itinéraire technique. La première de ses pratiques est de choisir des plants sains de l'organisme pathogène et de porter une préférence sur celles possédant une tolérance ou une résistance. Il est nécessaire de porter une attention particulière sur les autres sources de contamination, telles que : l'eau d'irrigation, le matériel agricole, les entrepôts de stockage et de transformation, les plantes de bordure de champ... (Janse, Araluppan, *et al.*, 1998). Si l'organisme pathogène est déjà présent sur le territoire, la stratégie s'oriente sur des rotations culturales dont la présence limite l'incidence du flétrissement bactérien (Akiew & Trevorrow, 1994; French, 1994; Hartman & Elphinstone, 1994; Saddler, 2005), ainsi que sur l'élimination systématique des tous les hôtes de *R. solanacearum* à proximité. D'autres solutions consistent dans le décalage de l'itinéraire cultural dans le temps afin d'éviter les périodes sensibles, souvent liées à une forte chaleur et une forte humidité, ou encore de modifier la structure ou la composition du sol pour mettre en place un milieu défavorable à *R. solanacearum* (Lemaga, Kakuhenzire, *et al.*, 2005; Saddler, 2005; Schönfeld, Gelsomino, *et al.*, 2003; van Elsas, van Overbeek, van Bailey, *et al.*, 2005).

La lutte chimique a rapidement été jugée inefficace pour contrôler le flétrissement bactérien, que ce soit par l'utilisation d'antibiotiques ou d'autres produits chimiques (Hartman & Elphinstone, 1994; Saddler, 2005). L'éradication complète de la faune et de la flore tellurique a été pratiquée, (Enfinger, McCarter, *et al.*, 1979) mais ne satisfait pas à l'équilibre écologique, induisant généralement plus de problèmes que ces solutions n'en règlent. En Europe, l'utilisation de fumigants pour la désinfection des sols, fait face à une législation stricte visant à préserver la diversité faunistique et floristique du sol : le protocole de Montréal a conclu en 1987 à une restriction sur le bromure de méthyle et sa disparition en 2005.

La compétition bactérienne au sein même du sol peut servir les ambitieux projets de lutte biologique. Cette stratégie a suscité un grand intérêt ces dernières années (Akiew &

Xanthomonas campestris qui synthétise en grande quantité du xanthane, un polysaccharide anionique soluble utilisé dans l'alimentation et l'industrie, ou encore *Zoogloea spp.*, utilisés dans bassins d'épuration pour son mucus capable de fixer des déchets organiques.

7.2 Le genre *Ralstonia*

Le genre *Ralstonia* a été nommé d'après Ericka Ralston, une bactériologiste américaine qui décrit et nomma en premier *Pseudomonas pickettii* et qui suggéra un rapprochement taxonomique avec *Pseudomonas solanacearum* (Ralston, Palleroni, *et al.*, 1973).

Les souches du genre *Ralstonia* sont des bâtonnets Gram-négatifs non sporulant. Ces souches peuvent être mobiles par le biais d'une flagellation monotriche ou péritriche, ou sont non mobiles. Aérobic stricte, ces souches sont capables de croissance sur milieu peptone ordinaire et seule l'espèce *eutropha* est de type chimolithotrophe facultative (Garritty, Bell, *et al.*, 2005). Le genre *Ralstonia* comprend officiellement cinq espèces dont trois sont isolées d'échantillons cliniques humains : *R. insidiosa*, *R. mannitolilytica*, et *R. pickettii* ; seules les deux dernières espèces sont pathogènes de l'Homme (Coenye, Goris, *et al.*, 2003; De Baere, Steyaert, *et al.*, 2001; Ralston, Palleroni, *et al.*, 1973). *R. pickettii* est souvent utilisé comme « outgroup » pour les études de comparaison génétique de *R. solanacearum*, bien que *R. mannitolilytica* soit plus proche phylogénétiquement de *R. solanacearum* (De Baere, Steyaert, *et al.*, 2001; Vandamme & Coenye, 2004; Vaneechoutte, Kämpfer, *et al.*, 2004).

De nombreux hôtes de *R. solanacearum* font partie de la famille des *Solanaceae* justifiant sa dénomination d'espèce. Brièvement appelé *Bacillus solanacearum* (Smith, 1886), puis *Pseudomonas solanacearum* (Smith 1914), *R. solanacearum* est capable d'accumuler de façon intracellulaire des granules lipidiques de poly-β-hydroxybutyrate (PHB) (Delafield, Doudoroff, *et al.*, 1965), considérées chez les bactéries Gram-négatives et Gram-positives comme des réserves énergétiques (Doudoroff & Stanier, 1959). Ces granules sont métabolisées pour la survie et la croissance quand une source de carbone externe n'est pas disponible (Handrick, Reinhardt, *et al.*, 2000; Uchino, Saito, *et al.*, 2008). La plupart des souches sont capables de dénitrifier et certaines produisent un pigment hydrosoluble diffusible brun foncé. Sa croissance est fortement ralentie dans un milieu contenant plus de 2% de NaCl ou à une température inférieure à 4°C ou supérieure à 40°C. Son contenu en G+C est compris entre 66 et 67%. *R. solanacearum* est un complexe d'espèces comprenant le genre *solanacearum*, mais des études de sérologie et de phylogénie ont révélé que BDB l'agent de la maladie du sang du bananier est proche de *R. solanacearum*. Néanmoins, sa reconnaissance taxonomique n'est toujours pas établie (Baharuddin, Rudolph, *et al.*, 1994; Coenye, Goris, *et al.*, 2003; Eden-Green, 1994; Taghavi, Hayward, *et al.*, 1996; Villa, Tsuchiya,

et al., 2005). Nous avons évoqué le cas de *R. syzygii*, précédemment connu sous *Pseudomonas syzygii* (Roberts, Eden-Green, et al., 1990), qui est un agent pathogène du giroflier en Indonésie. Appelée en anglais « Sumatra disease of clove », cette maladie est rapportée pour la première fois au début du XIXe siècle. La taxonomie (Eden-Green, 1994; Roberts, Eden-Green, et al., 1990) et l'analyse de séquences sur les ADN ribosomaux et sur d'autres gènes (De Baere, Steyaert, et al., 2001; Poussier, Prior, et al., 2000; Poussier, Trigalet-Demery, et al., 2000; Taghavi, Hayward, et al., 1996; Vaneechoutte, Kämpfer, et al., 2004; Villa, Tsuchiya, et al., 2005) ont montré que *R. syzygii* était proche de *R. solanacearum*, mais plus éloigné que ne l'est BDB. Les exigences nutritionnelles et le morphotype différent de *R. solanacearum* de par la croissance très réduite sur milieux standard et à 37°C, la sensibilité accrue au NaCl, et la cellule n'est ni mobile ni flagellée (Roberts, Eden-Green, et al., 1990).

De nombreux changements relatifs à la classification taxonomique de *R. solanacearum* ont permis de mieux cerner phylogénie du groupe *Burkholderia*. L'avènement des technologies basées sur l'analyse de l'ADN a ouvert de nouvelles voies dans la caractérisation du vivant, et des connaissances académiques restent encore à établir. Ainsi, les souches appartenant au genre *Ralstonia* apparaissent extrêmement diversifiées sur le plan de l'écologie. Concernant le pouvoir pathogène, le genre *Ralstonia* héberge des espèces cliniques d'intérêt en santé humaine, et le complexe d'espèces *R. solanacearum* dont la clarification de la systématique est toujours d'actualité : les relations phylogénétiques avec *R. syzygii* et l'agent du BDB sont en effet peu documentées. Il paraît nécessaire de poursuivre la caractérisation dans ce groupe pour développer les outils moléculaires de demain.

7.3 Le complexe d'espèces

7.3.1 La classification en races

Les pionniers que sont Yvan Buddenhagen et Luis Sequeira (1962) ont établi le système de classification en différentes races des souches de *R. solanacearum*. Ce système historique est encore utilisé dans la littérature récente et se base sur la caractérisation du pouvoir pathogène sur une gamme d'hôtes, mais n'a pas valeur de taxon tel que cela est accepté de manière académique. Trois races sont d'abord proposées (Buddenhagen & Kelman, 1964; Buddenhagen, 1986), puis deux autres ont été ajoutées afin de compléter la classification due à la découverte de souches pathogènes du gingembre (*Zingiber officinale*) et du mûrier blanc (*Morus alba*). Jusqu'à présent, la communauté scientifique a utilisé ce système de classification pour rendre compte de la diversité chez *R. solanacearum*.



Figure 14. Réponse hypersensible sur feuille de tabac (*Nicotiana tabacum*)

Infiltration de souches de *Ralstonia solanacearum* sur feuille de tabac, donnant lieu à une nécrose localisée des tissus, connue sous le nom de réponse d'hypersensibilité (HR).

Tableau 3. Tests physiologiques révélant la classification de *Ralstonia solanacearum* en Biovars^a

| Tests physiologiques | Biovars | | | | | |
|----------------------------|---------|---|-----|---|---|---|
| | 1 | 2 | 2-T | 3 | 4 | 5 |
| Hexose-alcools | | | | | | |
| Mannitol | - | - | - | + | + | + |
| Dulcitol (Galactitol) | - | - | - | + | + | - |
| Sorbitol (Glucitol) | - | - | - | + | + | - |
| Disaccharides | | | | | | |
| Maltose | - | + | + | + | - | + |
| Lactose | - | + | + | + | - | + |
| D-(+)-Cellobiose | - | + | + | + | - | + |
| Autres substrats | | | | | | |
| <i>myo</i> -Inositol | + | + | + | + | + | + |
| D-Ribose ^b | d | - | + | + | + | + |
| Trehalose | + | - | + | + | + | + |
| A partir du Nitrate | | | | | | |
| Nitrite | + | + | + | + | + | + |
| Gaz | - | - | - | + | + | + |

^a. + = 80% ou plus de souches positives ; - = 80% ou plus de souches négatives ; d = entre 21 et 79% de souches positives.

^b. Pour les Biovars 1 à 4, ces résultats n'ont été obtenus que sur une faible proportion de souches.

2000a). Ainsi, le spectre d'hôte des souches de race 3 semble être bien plus large que la description originelle à son sujet (Buddenhagen, Sequeira, *et al.*, 1962), comme cela est discuté dans le cadre de la thèse.

7.3.1.4 Race 4

Les souches de race 4 sont pathogènes du gingembre (Persley, Batugal, *et al.*, 1986) et sont signalées en Chine, Australie, Hawaï, le Japon, Malaisie, Inde, Philippines, Thaïlande, et l'île Maurice (Alvarez, 2005; Hayward, 1994a; Kumar, Sarma, *et al.*, 2004; Xu, Pan, *et al.*, 2009). Des inoculations artificielles ont aussi révélé la pathogénie de ces souches de race 4 sur tomate, aubergine, piment, et sur des herbacées telles que *S. nigrum* (*Solanaceae*) ou *Crassocephalum crepidiodes* (*Asteraceae*), mais sont peu agressives sur le Tabac (Pegg & Moffett, 1971) ; les infiltrations sur tabac mettent en évidence une lente coloration jaunâtre, comparable à celle développée par les souches de race 1 (Janse, 1991). Par contre, les souches de race 4 originaires d'Inde sont très méconnues. Certaines souches de race 1 ont été décrites comme faiblement agressives sur le gingembre, mais les autres races n'ont pas été décrites comme virulentes (Hayward, 1994a; Janse, 1991).

7.3.1.5 Race 5

Les souches de race 5 sont originaires de Chine et provoquent des flétrissements sur murier blanc (He, Sequeira, *et al.*, 1983). Les inoculations artificielles ont montré que les souches de race 5 sont faiblement virulentes sur pomme de terre et aubergine, et sont avirulentes sur tomate, piment, tabac, et arachide.

7.3.2 La classification en Biovars

Contrairement à la classification en races, basée sur la gamme d'hôtes, les 4 Biovars (Bv) historiques (codés 1 à 4) sont définis sur la base de l'oxydation de l'un des 3 disaccharides ou des 3 hexose-alcools (Hayward, 1964; Hayward, El-Nashaar, *et al.*, 1990). Ce système a été élargi plus tard avec d'autres substrats, la production de nitrite ou de gaz à partir du nitrate (Tableau 3) (Hayward, 1994b). Cette classification rapide, reproductible, et peu couteuse n'est utile que si l'organisme étudié est en culture pure et auparavant identifié comme appartenant au complexe d'espèces *R. solanacearum*. Les souches isolées de pomme de terre dans le bassin amazonien on put être différenciées de l'archétype Bv2 par des tests portant sur une gamme étendue de substrats par rapport à ceux premièrement utilisés dans cette classification en Bv (French, Aley, *et al.*, 1993; Hayward, 1994b) ; ces souches ont été classées dans le Bv2T, en rapport avec leur lieu d'origine tropical, ou encore N2 pour « New Biovar 2 ». En opposition à l'appellation du Bv2T, le Bv2 est souvent répertorié comme 2A du

Tableau 4. Classification de *Ralstonia solanacearum* en Races et Biovars

| Race | Hôtes | Distribution géographique | Biovar |
|------|---|---------------------------|--------|
| 1 | Divers | Asie, Australie | 3, 4 |
| | | Amérique | 1 |
| 2 | Banane, autres Musa spp. | Caräibe, Brésil, monde | 1 |
| 3 | Pomme de terre, autres Solanaceae, Gëranium, autres espèces | Monde, sauf USA et Canada | 2 |
| 4 | Gingembre | Asie | 3, 4 |
| 5 | Mûrier | Chine | 5 |

des souches couvrant cette diversité dans des groupes phylogénétiques : cette classification ne reflète pas la taxonomie établie et Cook et coll. (1989) la qualifièrent d'ambiguë et de non fiable. D'un point de vue purement pratique, les inoculations artificielles ne sont pas si simples à mettre en place et les résultats qui en découlent sont sujets à de nombreuses variations : choix des variétés considérées comme sensibles, conditions expérimentales, concentration et état physiologique des souches, méthode d'inoculation... Autant de paramètres qui ont tendance à surestimer le spectre d'hôte naturel des souches testées (Denny, 2006). Les travaux sur les voies métaboliques confirment la classification en races pour les souches de appartenant aux races 1, 2, et 3 (Janse, 1991) ; néanmoins, aucune étude de diversité à grande échelle n'a été reportée jusqu'à présent. Les conclusions tirées sur cette classification montrent plus qu'elle reflète en réalité les pathovars de l'organisme (Alvarez, 2005; Prior & Fegan, 2005). Le problème posé par les races ou Biovars est sa non-adéquation avec les méthodes de typages moléculaires : la race 1, tout comme le Bv1, se retrouve dans tous les groupes génétiques reconnus et si la race 3 Bv2 se retrouve aussi bien dans le phylotype Brown rot IIB-1, que le phylotype IV (Jeong, Kim, *et al.*, 2007).

7.3.3 Phylogénie du complexe d'espèces

De nombreuses études assez récentes portant sur la diversité génétique des souches de *R. solanacearum* sont disponibles. Elles valident l'existence de certains écotypes, comme les Brown rot et les Moko, et surtout elles consolident et prolongent notre perception des différents niveaux d'organisation et donc de la classification chez cet organisme. L'ouverture de l'ère des « omics » apporte véritablement une nouvelle dimension à la caractérisation de *R. solanacearum* et des organismes vivants au sens plus large. Études de diversité, d'évolution, de relations entre les organismes... ont permis au cours des dernières années d'affiner la résolution et de mieux résoudre les degrés d'organisation de groupes d'organismes auparavant liés.

7.3.3.1 La classification et les technologies de l'ADN

Cook et coll. (1989) ont été pionniers concernant l'approche phylogénétique qu'ils ont basé sur l'analyse du polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP) pour examiner 62 souches de *R. solanacearum* distribuées dans les quatre races et les cinq Biovars. Les Southern blots de restriction d'ADN génomique digéré aux endonucléases ont été sondés avec neuf régions génétiques relatives à la biosynthèse du tryptophane, à l'exopolysaccharide *EPS1*, au core lipopolysaccharide, à trois clusters de gènes à la fois impliqués dans la virulence (*hrp*) et dans les HR, ainsi qu'à trois régions de fonction inconnue. Un total de 28 groupes RFLP a été décrit et a été appelé MLG, pour MultiLocus Genotypes, formant deux clusters distincts. La Division I unifiée par les souches tombant

dans la race 1 Bv3, 4, et 5, et la Division II hébergeant les souches de race 1 Bv1 (r1Bv1) et les r2Bv3. Ces divisions apparaissent aussi dans l'analyse séparée des 9 sondes, suggérant une coévolution des loci analysés. Des analyses utilisant 8 des 9 sondes RFLP (Cook & Sequeira, 1994) sur un lot additionnel de 102 souches représentant, entre autres le Bv2T, ont permis de décrire un total de 46 MLG, confirmant la division précédente en deux groupes. La Division I « Asiaticum » est décrite comme étant liée aux régions d'Asie et de l'Océanie, quant à la Division II « Americanum », elle est décrite comme étant liée à la région des Amériques. Les souches de Bv2T sont alors classées dans la Division II, ouvrant avec le Bv2 un sous-groupe aux côtés du second, représenté par les souches de Bv1. Les souches de race 2 pathogènes de la banane sont distribuées dans les deux sous-clusters de la Division I. Malgré leurs différentes origines géographiques, les souches isolées de pomme de terre sont localisées dans le cluster MLG26, indiquant le caractère clonal de ces souches et une distribution géographique large probablement associée aux activités humaines, à la circulation des biens et des personnes. Malheureusement, ce typage n'est plus possible car les sondes on été perdues.

La voie était ouverte et l'approche déclinée avec de nombreuses autres techniques basées sur l'analyse de l'ADN, toutes contribuant régulièrement à compléter la caractérisation de la phylogénie chez *R. solanacearum* : des empreintes génétiques RFLP (Gillings & Fahy, 1993; van der Wolf, Bonants, *et al.*, 1998) ; à la réaction en chaine de polymérisation appliquée aux RFLP (Gillings, Fahy, *et al.*, 1993; Poussier, Trigalet-Demery, *et al.*, 2000; Poussier, Vandewalle, *et al.*, 1999) ; au polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (AFLP) (Poussier, Trigalet-Demery, *et al.*, 2000; van der Wolf, Bonants, *et al.*, 1998) ; les PCR à ARNt consensus (Seal, Jackson, *et al.*, 1992) ; et les marqueurs basés sur PCR d'éléments répétés (rep-PCR) (Horita & Tsuchiya, 2001; Thwaites, Mansfield, *et al.*, 1999; van der Wolf, Bonants, *et al.*, 1998).

Les techniques les plus actuelles sont basées sur le séquençage complet ou partiel de loci dont l'évolution est lente au sein de l'espèce rendant ainsi compte du passé évolutif lointain, comme l'ADN ribosomal 16S. Les arbres phylogénétiques sont obtenus grâce à (i) l'analyse du polymorphisme de séquences ; (ii) l'analyse des distances génétiques ; et (iii) l'analyse des clusters (Fegan & Prior, 2005; Li, Dorsch, *et al.*, 1993; Poussier, Prior, *et al.*, 2000; Villa, Tsuchiya, *et al.*, 2005). La résolution de l'arbre dépend du nombre de souches, de leurs choix basés sur leur potentiel de représentativité, mais aussi sur le locus considéré ; l'étude de la relation entre des espèces très proches demandera de choisir un locus à vitesse évolutive plus grande que pour l'étude d'espèces éloignées. Les loci considérés à ce jour sont au nombre de six : (i) *egl*, une endoglucanase ; (ii) *mutS*, un système de réparation des impairs sur l'ADN ; (iii) *hrpB*, une protéine régulatrice de type AraC dans le cluster de gène *hrp* ; (iv)

Tableau 5. Correspondance des systèmes de classification de *Ralstonia solanacearum* basés sur le phénotype (Races et Biovars) et sur les technologies de l'ADN (Phylotypes, sequevars, RFLP, 16S et MLG)^a

| Phylotype | Origine | Sequevar | RFLP | 16S | Races | Biovar | MLG | Hôte d'origine |
|----------------------|-------------------|----------|------|-----|-------|--------|----------------------|---------------------------------|
| I | Asie et Océanie | 12-18 | I | 1 | 1 | 3 | 8-14 | Nombreux |
| | | | | | | 4 | 11, 15-18, 42 | Nombreux |
| | | | | | 4 | 4 | 22-23 | Gingembre |
| | | | | | 5 | 5 | 19-20 | Murier |
| | | | | | | 2-T | | Piment, Tomate |
| IIA | Amériques | 5,7 | | | 1 | 1 | 1-7, 38 | Nombreux |
| | | 6 | | | 1 | 1 | 28, 46 | <i>Musaceae</i> |
| IIB | Amériques | 3-4 | II | 2A | 2 | 1 | 24-25 | <i>Musaceae</i> |
| | | 1-2 | | | 3 | 2 | 26-27, 34 | Pomme de terre (principalement) |
| | | | | | | 2-T | 29-31, 33, 36-37, 39 | Pomme de terre et aubergine |
| III | Afrique | 19-23 | ND | ND | | 1 | ND | Nombreux |
| | | | | | | 2-T | ND | Pomme de terre |
| IV | Indonésie et Asie | | ND | 2B | | 1 | ND | Giroflier |
| | | 11 | | | | 2 | ND | Giroflier, pomme de terre |
| | | 8 | | | | 2-T | ND | Pomme de terre |
| | | 10 | | | | 2-T | ND | <i>Musaceae</i> |
| IV BDB | | 10 | | | | 2-T | ND | <i>Musaceae</i> |
| IV <i>R. syzygii</i> | | 9 | | | | 1 | ND | Giroflier |

^a Phylotypes et sequevars (Fegan & Prior, 2005; Villa, Tsuchiya, *et al.*, 2005) ; RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Cook & Sequeira, 1994) ; 16S ADNr (Poussier, Trigalet-Demery, *et al.*, 2000; Taghavi, Hayward, *et al.*, 1996); MLG (MultiLocus Genotype) ; Biovars et Hôte d'origine sont de multiples sources ; NA = Non Disponible.

pehA, une endopolygalacturonase ; (v) la région intergénique adjacente du gène *lpxC* ; et (vi) la région ITS, région de l'espace intergénique 16S-23S.

7.3.3.2 Le schéma de classification en phylotypes et sequevars

La nouvelle classification hiérarchique proposée par Fegan et Prior (2005) propose une structuration en quatre groupes majeurs, les phylotypes, pour qui correspondent des clusters de souches révélés par le séquençage partiel des gènes *egl*, *hrpB* et *mutS* (Fegan & Prior, 2005; Prior & Fegan, 2005). Les séquences publiées dans le schéma proposé sur un locus donné peuvent être réutilisées pour structurer et compléter d'autres arbres phylogénétiques basés sur le même locus. Par ailleurs, les deux grandes divisions observées par Cook et coll. (1994) sont conservées et la diversité découverte dans les souches originaires d'Afrique et d'Indonésie a permis d'étendre ces deux divisions à quatre. Ces quatre phylotypes tendent à refléter l'origine géographique des souches (Villa, Tsuchiya, *et al.*, 2005) : Asie (phylotype I), Amérique (phylotype II), Afrique (phylotype III), et Indonésie, Japon et Australie (phylotype IV), regroupant aussi *R. syzygii* et BDB. Les travaux de références montrent aussi que le phylotype II américain possède deux sous-clusters notés IIA et IIB (Prior & Fegan, 2005; Villa, Tsuchiya, *et al.*, 2005). Les mêmes relations de groupes ont été observées pour les loci analysés, suggérant une coévolution des régions concernées par ces loci. Ce n'est néanmoins pas le cas de tous les loci, puisque le séquençage de GMI1000 dans un premier temps, puis plus tard de Molk2, IPO1609 et CFBP2957, CMR15, et PSI07, montre que le génome de *R. solanacearum* est composé d'une mosaïque de gènes vraisemblablement acquis par transferts horizontaux (Salanoubat, Genin, *et al.*, 2002).

Chacun de ces phylotypes est subdivisé en sequevars uniques reflétant une définition de travail pour laquelle les souches possèdent, à l'intérieur d'un même sequevar, une variation de séquence très faible sur un locus cible ; pour l'*egl*, ce seuil est de 1% sur une totalité de 700 pb environ. Un nouveau sequevar est décrit si au moins deux souches possèdent des séquences similaires hautement conservées dans le même locus. Les sequevars rejoignent les groupes MLG produits par RFLP et décrivent un groupement similaire de souches (Tableau 5). Néanmoins, l'analyse ne porte que sur un locus donné et les souches distribuées dans les sequevars ne sont pas comparables avec un autre locus (Villa, Tsuchiya, *et al.*, 2005) : à chaque locus correspond un profil de sequevar donné. Ainsi, jusqu'à l'établissement d'un schéma « Multilocus Sequence Typing » (MLST) ou « Multilocus Sequence Analysis » (MLSA), il n'est pour l'instant pas possible de comparer les loci et donc leur phylogénie entre eux.

Les principaux avantages de cette classification sont le puissant pouvoir de résolution de la diversité génétique et de la phylogénie, et aussi le fait que contrairement à toute autre

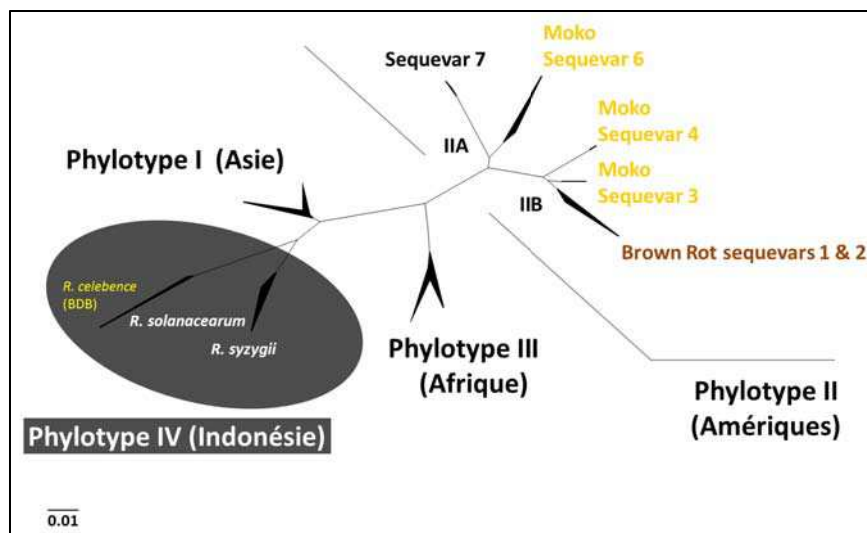


Figure 15. Phylogénie du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*

Arbre phylogénétique du complexe d'espèces *R. solanacearum* basé sur le séquençage partiel de l'endoglucanase (*egl*) (Fegan & Prior, 2005; Villa, Tsuchiya, *et al.*, 2005).

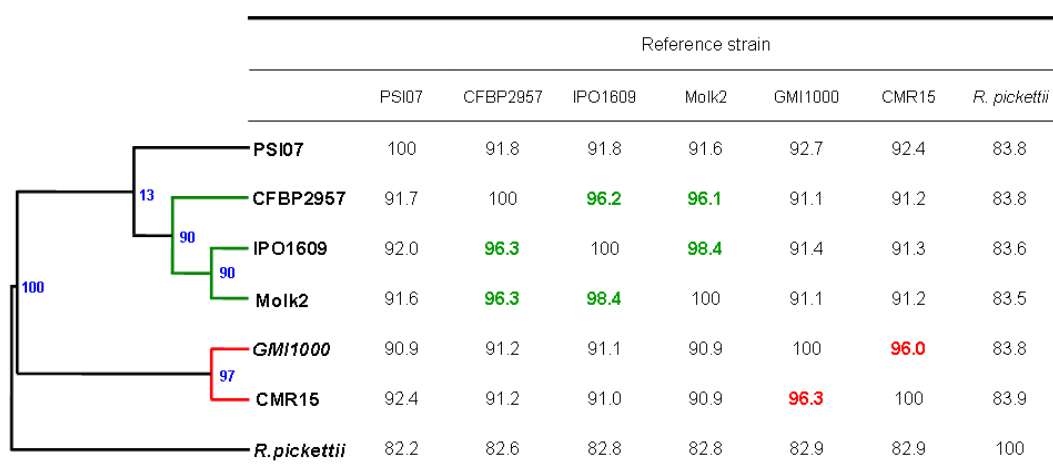


Figure 16. Analyse du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* basée sur l'ANI (Average Nucleotide Identity)

Figure provenant du travail de recherche de Remenant et coll. (2010), montrant la description de trois espèces génomiques, basée sur un coefficient d'ANI (Goris, Konstantinidis, *et al.*, 2007; Konstantinidis & Tiedje, 2005) supérieur à 95%. Les souches GMI1000 de phylotype I (I) et CMR15 (III) forment une première espèce génomique ; les souches MolK2 (IIB), IPO1609 (IIB) et CFBP2957(IIA) forment une deuxième espèce génomique ; et PSI07 (IV) forme une troisième espèce génomique. Les valeurs de bootstrap sont indiquées en bleu sur l'arbre phylogénétique à gauche. La souche *R. pickettii* est considérée comme un outgroup à la phylogénie de *R. solanacearum*.

méthode de classification cette méthode est additive. Ce schéma de classification hiérarchique autorise l'identification de nouveaux sequevars ou de nouveaux phylotypes au fur et à mesure de l'enrichissement des bases de données de séquences dédiées. Bien que peu probable (Fegan & Prior, 2005), la description de nouveaux phylotypes reste une possibilité biologique, car nous ne disposons certainement pas encore de représentant de toutes les souches, mais ce système de classification permettra de les repérer instantanément. De récents travaux menés par Remenant et coll. (2010) donnent un nouvel aperçu du complexe d'espèces *R. solanacearum* (Figure 15), en décrivant de nouvelles espèces génomiques (Figure 16). En effet, il a été décrit le rapprochement des phylotypes I et III dans une espèce génomique, distincte de l'espèce génomique représentée par le phylotype II et de la dernière espèce génomique représentée par le phylotype IV.

Les avancées de la génétique et de la biologie moléculaire ont permis en un peu plus de 20 ans de rendre compte de la diversité génétique et de la phylogénie de *R. solanacearum* sous un nouvel angle. La classification en race/Biovar a rendu des services considérables pour mettre de l'ordre dans l'extraordinaire diversité rencontrée chez cet organisme. Sur ces bases, les différentes technologies basées sur l'exploration de l'ADN ont permis des avancées majeures dans la classification. La nouvelle classification en phylotype/sequevar offre la souplesse attendue par la communauté scientifique, car elle rend le mieux compte de la réalité de certains groupes biologique que sont les différents écotypes de *R. solanacearum*. Les données à venir en matière de typage MLSA/MLST, mais surtout la mise à disposition de génomes complets permettront une avancée majeure qui est la définition biologique du complexe d'espèces *R. solanacearum*. Cela n'est possible que si les souches candidates, qui feront l'objet de ces études, sont sélectionnées sur la base de caractéristiques phénotypiques établies sans aucun a priori et avec beaucoup de rigueur.

8 Organisation du génome

8.1 Description

R. solanacearum est une espèce hétérogène, aussi bien d'un point de vu phénotypique que génotypique, comme en atteste sa phylogénie en complexe d'espèces (Fegan & Prior, 2005; Gillings & Fahy, 1994). Sa riche diversité physiologique et écologique est reflétée par l'organisation et la composition particulière de son génome (Genin & Boucher, 2004; Salanoubat, Genin, *et al.*, 2002). Les premiers travaux de séquençage ont porté sur la souche de *R. solanacearum* GMI1000 dont le génome a été publié en 2002 par l'équipe de C. Boucher (Salanoubat, Genin, *et al.*). Depuis cette publication, de nouveaux efforts de séquençage ont été consentis pour caractériser le pangénome de cet agent pathogène, mais

gènes codant pour des enzymes nécessaires au métabolisme primaire (Remenant, Coupat-Goutaland, *et al.*, 2010; Salanoubat, Genin, *et al.*, 2002), ainsi que la plupart des gènes impliqués dans le phénotype virulent. Il pourrait aussi avoir un grand rôle à jouer dans l'adaptation de *R. solanacearum* pour diverses pressions environnementales (Salanoubat, Genin, *et al.*, 2002), comme en atteste la présence de plusieurs copies des opérons d'ADN ribosomiaux (Klappenbach, Dunbar, *et al.*, 2000). Les caractéristiques de ce mégaplasme suggèrent une acquisition originelle plasmidique, (Salanoubat, Genin, *et al.*, 2002) et la présence de nombreux gènes de ménage partagés par les deux réplicons ayant trait à la pathogénie (Guidot, Prior, *et al.*, 2007) ou à la biosynthèse des acides aminés, des nucléotides et des cofacteurs, (Genin & Boucher, 2004) atteste d'une acquisition et d'une histoire évolutive commune très ancienne (Coenye & Vandamme, 2003) qui fait de *R. solanacearum* un organisme pathogène très ancien. De plus, les caractéristiques structurales similaires de composition en G+C et de l'usage de codons des deux réplicons appuient cette hypothèse (Coenye & Vandamme, 2003). Cependant, des données supplémentaires sont nécessaires pour confirmer si le mégaplasme serait issu d'un chromosome de *R. solanacearum* ancestral (Coenye & Vandamme, 2003) ou s'il été originellement un plasmide accessoire dans un ancêtre de *R. solanacearum* qui aurait évolué dans le sens d'un composant obligatoire de la structure du génome (Genin & Boucher, 2004).

R. solanacearum a un génome mosaïque car tout au long de son évolution, cet organisme a acquis horizontalement de nombreux fragments d'ADN, homogènement distribués sur les deux réplicons (Remenant, Coupat-Goutaland, *et al.*, 2010; Salanoubat, Genin, *et al.*, 2002). Il est estimé que 16% du génome de la souche GM11000 est d'origine exogène (Nakamura, Itoh, *et al.*, 2004), confirmant le fait que les souches de *R. solanacearum* sont naturellement compétentes pour l'acquisition et la recombinaison d'ADN exogène par transformation naturelle (Bertolla, Frostegard, *et al.*, 1999; Bertolla, Van Gijsegem, *et al.*, 1997; Coupat, Chaumeille-Dole, *et al.*, 2008; Guidot, Coupat, *et al.*, 2009). Certains des effecteurs de virulences ont d'ailleurs été localisés dans des îlots génomiques (Dobrindt, Hochhut, *et al.*, 2004), appelés alors îlots de pathogénie (Salanoubat, Genin, *et al.*, 2002), et témoignent des échanges de matériels génétiques.

2003; White, Yang, *et al.*, 2000) ; ces facteurs sont alors appelés protéines d'avirulence car elles restreignent la gamme d'hôtes de l'organisme pathogène. *R. solanacearum* possède un SSTIII localisé sur une région de 20 à 25 Kb du mégaplasme (Van Gijsegem, Gough, *et al.*, 1995; Van Gijsegem, Vasse, *et al.*, 2002), possède sept unités de transcription regroupant au moins 20 gènes (Brito, Marenda, *et al.*, 1999; Schell, 2000).

La virulence de *R. solanacearum* est contrôlée par un réseau complexe dont le noyau est le système Phc (conversion phénotypique et quorum-sensing) (Schell, 2000). Mais il existe un système en amont du SSTIII qui régule l'expression des gènes de *R. solanacearum* au début et durant toute la phase parasitique dans l'hôte : HrpG (Brito, Aldon, *et al.*, 2002; Brito, Marenda, *et al.*, 1999; Valls, Genin, *et al.*, 2006; Vasse, Genin, *et al.*, 2000). Ce régulateur clé est un facteur de transcription activé par au moins trois signaux environnementaux : quorum-sensing, contact physique avec l'hôte et l'état métabolique bactérien. Il est en amont du SSTIII et implique une régulation de nombreux facteurs de virulence et autres fonctions impliquées dans l'adaptation de la cellule bactérienne dans son environnement (Valls, Genin, *et al.*, 2006).

QUESTIONS DE RECHERCHE

QUESTIONS DE RECHERCHE

Le pathosystème constitué par les différentes combinaisons souche/hôtes chez *R. solanacearum* est d'une richesse et d'une complexité telle, qu'il reflète l'extrême diversité de cet agent pathogène. Caractérisée par une grande hétérogénéité, cette espèce est distribuée dans plusieurs milliers de lignées qui constituent un complexe d'espèces dont font partie l'agent du Blood Disease Bacterium (BDB) et *R. syzygii* agent du Sumatra Disease of Clove. Aujourd'hui, la classification phylogénétique de *R. solanacearum* en phylotypes et sequevars est devenue la référence en assignant un potentiel de spectre d'hôtes à la position phylogénétique précise des lignées.

Mes travaux de thèse viseront ainsi à apporter des connaissances originales dans la caractérisation de l'agent pathogène *R. solanacearum*, avec une attention particulière pour le phylotype II, tant au niveau des différents degrés de diversités phylogénétiques, phénotypique et génétique, qu'au niveau de l'écologie moléculaire du complexe d'espèces formé. Ils déboucheront sur un bilan exhaustif de la diversité des souches d'intérêt et sur des outils moléculaires innovant dans les applications de recherche et de diagnostic de cette phyto bactériose.

J'ai donc assemblé une collection de souches de *R. solanacearum* représentatives des événements épidémiques relatifs au flétrissement bactérien rapportés en France, dans le reste de l'Europe et, *in extenso*, dans le bassin méditerranéen. Le panel de souches a été sélectionné sur la base de critères permettant de représenter au mieux les différents degrés de la diversité déjà reconnue : l'hôte de prédilection, la position phylogénétique et l'origine géographique. Une attention particulière a porté sur les souches capables de flétrir la pomme de terre, ainsi que toutes souches représentatives d'écotypes jusqu'alors peu documentés. Cet assemblage de souche est destiné à répondre de manière pertinente à certaines questions fondamentales qui sont explorées dans ce travail de thèse, en particulier :

- (i) Quel est le degré de diversité génétique des souches du complexe d'espèces *R. solanacearum* sévissant en France, en Europe et dans le bassin méditerranéen ?
- (ii) Peut-on décrire différents pathotypes au sein des écotypes du complexe d'espèces *R. solanacearum* ?
- (iii) Quels sont les mécanismes évolutifs qui expliquent les écotypes ?

Les avancées conceptuelles sur la classification du complexe d'espèces en phylotypes semblent en effet révéler, pour certains groupes écologiques, une bonne cohérence entre diversité génétique et diversité phénotypique ; en particulier pour ce qui concerne l'adaptation à l'hôte : les souches provoquant la maladie de la Moko du bananier (IIA-6, IIB-3 et IIB-4) ou encore, les souches Brown rot de la pomme de terre (IIB-1). Les données de phylogénie rapportées dans la littérature s'accordent unanimement à déclarer le caractère monophylétique des souches Brown rot ; aussi nous avons opté pour le point de vue original consistant à porter l'effort sur la description d'éventuels pathotypes au sein de ce groupe génétique, comme dans l'ensemble des souches pathogènes de la pomme de terre.

Je porterai ensuite mon intérêt sur l'analyse comparative de la virulence et de l'agressivité de ces souches. Des données expérimentales seront recherchées lors d'interactions en réponse aux contraintes de température ayant valeur de modèle pour les zones de culture de la pomme de terre en climat tempéré (Europe et hauts plateaux d'altitude) et aussi en réponse aux risques encourus à d'autres cultures maraichères (tomate et aubergine).

L'accumulation de ces données expérimentales va me permettre de tirer un bilan exhaustif du degré de diversité phénotypique auquel les acteurs de la filière Pomme de terre ont et devront faire face. Les groupes identifiés seront utilisés pour bioguider l'identification de marqueurs moléculaires afin d'identifier éventuellement des niveaux de diversités génétiques jusqu'alors insoupçonnés. Ces analyses seront confrontées aux données de génomique disponibles sur les génomes de ce complexe d'espèces et permettront l'identification des souches d'intérêt prioritaire pour le séquençage et la description pangénomique de *R. solanacearum*.

Cet effort de séquençage et d'annotation experte viendra parfaire la connaissance de la diversité génétique connue en décrivant de manière exhaustive les contenus en gènes dans huit souches couvrant le complexe d'espèces. L'intérêt est évident, et se situe aussi bien au plan de la génomique comparative et évolutive (dynamique du génome), que sur la conception d'une puce à ADN pangénomique pour l'analyse haut débit du génome de nombreuses souches. Les répertoires des gènes spécifiques à chacun des groupes génétiques seront obtenus par une approche de génomique comparative en référence aux données de bio-informatiques préexistantes et nouvellement produite par cette puce de recherche. Il sera question de d'analyser l'ensemble de ces données et de tenter d'identifier les répertoires de gènes responsables du « succès » de *R. solanacearum* en tant qu'organisme phytopathogène, mais aussi l'impact de la dynamique du génome sur la spécialisation des souches de *R. solanacearum* du phylotype II.

CHAPITRE 2 : LES ECOTYPES AFRICAINS

CHAPITRE 2

LES ECOTYPES AFRICAINS

La compréhension tant écologique qu'évolutive du modèle bactérien *R. solanacearum* est un véritable défi scientifique. Cet agent pathogène est en effet capable d'une inhabituelle capacité d'adaptation aux contraintes agropédoclimatiques qui permet d'expliquer son ubiquité à la surface du globe. Les études récentes menées sur la phylogénie de ce complexe d'espèces contribuent à mieux caractériser la biodiversité de cet agent pathogène, tant phénotypique que génétique, et ouvrent de nouvelles perspectives biologiques. C'est en ce sens que la classification additive en phylotypes et en sequevars de Fegan et Prior (2005) a ouvert une voie. Ce schéma décrit la diversité génétique et la phylogénie dans ce complexe d'espèces au plan du phylotype, qui subdivise l'espèce en quatre groupes majeurs, constitués de sequevars et de clones. Cette classification rend mieux compte de la diversité biogéographique connue et dévoile un niveau de diversité jusqu'alors insoupçonné. Alors que des données, parfois fragmentaires, existent dans la description de pathotypes associés aux souches des différents phylotypes et écotypes de *R. solanacearum*, seules les souches du phylotype III n'étaient pas encore caractérisées. De plus, ces souches semblaient être endémiques de la région africaine. Ainsi la motivation principale pour cette étude extensive a été de saisir l'opportunité de compléter la caractérisation phylogénétique de ce groupe majeur du complexe d'espèces (Fegan & Prior, 2005; Poussier, Trigalet-Demery, *et al.*, 2000; Poussier, Vandewalle, *et al.*, 1999) par des données sur les traits phénotypiques associés et par la même occasion, de dresser un bilan de la diversité des souches présentes au Cameroun. Ces connaissances sont indispensables pour compléter la description des pathotypes associés aux différents écotypes que l'on pourra identifier, ainsi que de renseigner la diversité existante dans la phylogénie de *R. solanacearum*.

Mon implication, dans ce travail exploratoire, se situe au niveau de la description des différents pathotypes associés à ces souches de phylotype III. Le choix de variétés permettant de discerner ces pathotypes est en effet important pour obtenir une discrimination des écotypes et s'est basé sur l'adaptation de précédents travaux de recherche (Carmeille, Caranta, *et al.*, 2006; Carmeille, Prior, *et al.*, 2006; Lebeau, Daunay, *et al.*, 2010). De plus cela a été l'occasion de mettre au point des protocoles expérimentaux robustes pour les tests en chambres climatiques. Ainsi, ces données expérimentales devaient permettre de clarifier le statut des souches froides en Afrique adaptées aux hauts plateaux et de déterminer si l'écotype en cause devait être assigné dans un groupe de souches connues de type Brown rot (phylotype IIB-1 ou IIB-2) ou s'il s'agissait d'un nouvel écotype dans le phylotype III africain. Il s'agissait par la même occasion de compléter nos

connaissances des souches unifiant ce phylotype pour orienter le choix de la souche de ce groupe phylogénétique majeur à envoyer au séquençage, afin d'avoir une représentativité optimale du complexe d'espèces.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue internationale *Plant Disease*.

Mahbou Somo Toukam, G., **Cellier, G.**, Wicker, E., Guilbaud, C., Kahane, R., Allen, C., & Prior, P. (2009). Broad Diversity of *Ralstonia solanacearum* Strains in Cameroon. *Plant Disease*, 93(11), 1123-1130.

Broad Diversity of *Ralstonia solanacearum* Strains in Cameroon

Gabriel Mahbou Somo Toukam, Institut de Recherche Agronomique pour le développement, IRAD, Programme Légumineuses et Cultures Maraîchères, Yaoundé, BP 2067 Yaoundé, Cameroun; **Gilles Cellier** and **Emmanuel Wicker**, CIRAD, UMRC53, Peuplement Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical (PVBMT), F-97410, Saint-Pierre, La Réunion, France; **Caroline Guilbaud**, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Avignon, Station de Pathologie Végétale, BP94, Montfavet, F-84140, France; **Rémi Kahane**, CIRAD, UPR Horticulture, Bd de la Lironde, F-34398 Montpellier, France; **Caitilyn Allen**, Department of Plant Pathology, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI 53706, USA; and **Philippe Prior**, CIRAD-INRA, UMRC53 PVBMT, F-97410, Saint-Pierre, La Réunion, France

ABSTRACT

Mahbou Somo Toukam, G., Cellier, G., Wicker, E., Guilbaud, C., Kahane, R., Allen, C., and Prior, P. 2009. Broad diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon. Plant Dis. 93:1123-1130.

In 2005, an extensive survey of bacterial wilt in Cameroon collected 110 strains of *Ralstonia solanacearum* from wilting tomato, potato, pepper, huckleberry (*Solanum scabrum*), sesame, and amaranth. The genetic diversity and phylogeny of selected strains from Cameroon were assessed by multiplex-polymerase chain reaction (PCR), race 3/biovar 2-specific PCR, and sequence analyses of the *mutS* and *egl* genes. These data were compared with those from 33 reference strains covering the known diversity within the *R. solanacearum* species complex. Strains isolated in Cameroon clustered into three of the four known phylotypes: I (Asian), II (American), and III (African). Lowland tomato strains belonged to phylotype I and were quite homogeneous. The strains belonging to phylotype II were genetically diverse, and partitioned into subclusters IIA and IIB (sequevar 1, race 3/biovar 2). Cameroon strains in the African phylotype III were distinct from reference strains from Zimbabwe or the Indian Ocean, highlighting the genetic diversity present within this phylotype. Strains from potatoes growing in the highlands of West Cameroon fell into both phylotypes II (race 3/biovar 2) and III. These phylotype II and III highland strains attacked both potato and tomato and could therefore pose an economic threat to potato and tomato crops throughout Central Africa. This is the first comprehensive report on the genetic diversity of *R. solanacearum* strains in Cameroon.

Bacterial wilt, the vascular disease caused by the soilborne bacterium *Ralstonia solanacearum*, is regarded as a major limiting factor for many crops worldwide, including subsistence food crops, small farming cash crops, and industrial crops including vegetables (*Solanum tuberosum*, *S. lycopersicum*, *Capsicum* spp.), banana (*Musa* spp.), peanuts (*Arachis hypogaea*), and tobacco (*Nicotiana tabacum*) (15). Global economic losses due to bacterial wilt of potatoes have been estimated at US\$950 million per year (5). This disease,

also known as potato brown rot, is caused by the biovar 2 Andean subgroup of *R. solanacearum*, historically known as race 3 biovar 2 (R3bv2). R3bv2 is a quarantine pest in Europe and North America, and is listed in the United States as a bioterrorism Select Agent (20). In Africa, losses due to this pathogen have a major socio-economic impact on key resource crops such as tomato, pepper, eggplant, and potato (43), which are a source of cash for thousands of low-income farmers, especially in Cameroon (11). Bacterial wilt severely affects huckleberry (*Solanum scabrum*), also called African nightshade, an indigenous leafy vegetable widely grown in the humid forest zone of West and Central Africa as a subsistence food crop and cultivated for its edible leaves in more than 20 African countries (11).

Many different strategies have been evaluated for the control of bacterial wilt. These include soil disinfection (15), soil amendment (21,22,34), biological control (30,36), chemical elicitors of systemic acquired resistance (26), and the use of genetic resources such as resistant rootstock for grafting of susceptible varieties (12). To date, breeding for resistance to bacterial wilt is still considered the most

promising strategy for long-lasting control (29). Unfortunately, wilt resistance often breaks down due to the genomic plasticity and the large genetic and phenotypic diversity within the *R. solanacearum* species complex (6,10). For example, tomato lines that were resistant to bacterial wilt in one geographic area were susceptible in another because of local pathogen strain variation (40). In addition, the effectiveness of genetic resistance is highly dependent on the subtle interactions among host, pathogen, and environmental conditions (14,29,40,41). Thus, knowledge of local pathogen diversity is a key prerequisite for successful disease resistance breeding.

Historically, *R. solanacearum* was subclassified into races and biovars, but these systems were neither predictive nor phylogenetically meaningful. Recently, Fegan and Prior (6) proposed a new hierarchical classification scheme, based on sequence analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region, the endoglucanase (*egl*) gene, and the *hrpB* gene, that subdivides *R. solanacearum* into phylotypes, defined as “a monophyletic cluster of strains revealed by phylogenetic analysis of sequence data” (6,7). Four phylotypes were distinguished. Phylotype I corresponds to the “Asiaticum” division 1 of Cook et al. (3) and contains strains belonging to biovars 3, 4, and 5. Phylotype II corresponds to the “Americum” division 2 of Cook et al. (3) and contains strains belonging to biovar 1/race 1, biovar 1/race 2 (Moko disease-causing strains), R3bv2, and biovar 2T strains. Phylotype III contains strains from Africa and the Indian Ocean, which belong to biovars 1 and 2T. Phylotype IV contains strains from Indonesia, some strains from Japan, and a single strain from Australia, belonging variously to biovars 1, 2, and 2T. Phylotype IV also contains the closely related species *Ralstonia syzygii* and the banana blood disease bacterium (BDB). Each phylotype can be further subdivided into sequevars based on differences in sequence of a 750-bp region of the endoglucanase (*egl*) gene. The phylogenetic scheme proposed by Fegan and Prior (6) is broadly consistent with the former phenotypic and molecular typing

Corresponding author: Philippe Prior
E-mail: philippe.prior@cirad.fr

Accession numbers: GenBank EF439725 to EF439812.

*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that two supplemental tables are available online.

Accepted for publication 23 June 2009.

doi:10.1094/PDIS-93-11-1123

This article is in the public domain and not copyrightable. It may be freely reprinted with customary crediting of the source. The American Phytopathological Society, 2009.

schemes, and adds valuable information about the geographical origin and in some cases the pathogenicity of strains. A recent study (13) hybridized genomic DNA of 18 strains, representative of the known diversity within the *R. solanacearum* species complex, to a microarray of genes from the sequenced genome of strain GMI1000. The resulting hierarchical clustering of strains perfectly matched the previous classification in four phylotypes.

To date, although bacterial wilt disease is known to be widespread in Africa, the genetic diversity of *R. solanacearum* strains prevalent on the continent, and in Cameroon in particular, is scarcely documented. Strains were reported and described from potato crops in Kenya, Burundi, Nigeria, Egypt (35), South Africa (37), and Ethiopia (18), from tobacco crops in Zimbabwe (31), from eucalyptus in South Africa (4,9), from groundnut in Uganda (1), and from tomato in Benin (42). However, "there is little or no published information on distribution or importance" (5).

Understanding local pathogen diversity is the foundation of a successful breeding and integrated management program (33). In Cameroon, a breeding program was launched to improve bacterial wilt resistance in pepper. The purpose of this present study was to assess the overall genetic diversity of *R. solanacearum* that may challenge new pepper germplasm. The resulting distribution and diversity map of the pathogen populations will be used to optimize this pepper breeding program, but also to focus African bacterial wilt control strategies in Solanaceous crops, including potatoes.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. Strains used in this study ($n = 143$) are listed in Table 1 and Supplemental Table 1. They include *R. solanacearum* strains from Cameroon ($n = 110$) and international reference strains ($n = 33$) provided by authors and obtained from collections (Collection Françaises de Bactéries Phytopathogènes [CFBP], Angers, France).

Strains were collected throughout Cameroon in March 2005 during an extensive survey covering a linear distance of about 2,500 km. Fifty-two sites were identified by local or regional extension agents and surveyed for sampling. Various host species of economic importance were sampled, including tomato (*Solanum lycopersicum*), sweet pepper (*Capsicum annuum*), hot pepper (*Capsicum chinense*), potato (*Solanum tuberosum*), huckleberry (*S. scabrum*), amaranth (*Amaranthus* spp.), and sesame (*Sesamum* spp.). Two priorities guided the survey: (i) representing the five different agro-ecological zones (AEZ) present in Cameroon (Table 2), and (ii) sampling the major vegetable cropping areas within each AEZ where bacterial wilt

was known to be the major biotic constraint to crop production. Most fields had a single collection site, but some large fields were sampled at two sites. At each collection site, two or three plants showing typical bacterial wilt symptoms were cut at midstem, and stem pieces (6 to 10 cm long) were kept at about 20°C in a cool box prior to isolation of *R. solanacearum*. Sampling and isolations were done on the same day. Samples were surface-disinfected with 70% ethanol, peeled, subsampled, and macerated in sterile distilled water. Macerates were streaked on Kel-

man's triphenyltetrazolium chloride (TZC) agar medium (17) supplemented with 1% yeast extract. Plates were incubated at room temperature ($28 \pm 5^\circ\text{C}$). Bacterial colonies developing the typical irregular mucoid *R. solanacearum* morphotype were then subcultured on fresh TZC medium for further purification. Isolated strains of *R. solanacearum* were given an isolate number and stored in sterile water at room temperature.

A set of 44 representative *R. solanacearum* strains from Cameroon, chosen on the basis of their phylotype assignment, host

Table 1. *Ralstonia solanacearum* strains used in this study

| Strain ^a | Host | Origin (AEZ) ^b | Phylotype/ sequevar ^c | Pathogenicity tested ^d | Reference ^e |
|------------------------------|-------------|---------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| Strains from Cameroon | | | | | |
| CMR1 | Tomato | Obala (V) | I/13 | | TS |
| CMR7 | Tomato | Obala (V) | I/13 | | TS |
| CMR13 | Tomato | Obala (V) | I/13 | | TS |
| CMR134 | Huckleberry | Bafia (V) | I/13 | YES | TS |
| CMR137 | Tomato | Bafia (V) | I/13 | | TS |
| CMR96 | Huckleberry | Akonolinga (V) | I/13 | | TS |
| CMR117 | Tomato | Yaoundé (V) | I/13 | | TS |
| CMR109 | Tomato | Yaoundé (V) | I/13 | | TS |
| CMR111 | Amaranthus | Yaoundé (V) | I/13 | | TS |
| CMR128 | Tomato | Yaoundé (V) | I/13 | | TS |
| CMR17 | Tomato | Obala (V) | I/14 | | TS |
| CMR123 | Tomato | Yaoundé (V) | I/14 | | TS |
| CMR87 | Tomato | Akonolinga (V) | IIA/35 | | TS |
| CMR89 | Tomato | Akonolinga (V) | IIA/35 | | TS |
| CMR91 | Huckleberry | Akonolinga (V) | IIA/35 | | TS |
| CMR102 | Tomato | Akonolinga (V) | IIA/35 | | TS |
| CMR120 | Tomato | Yaoundé (V) | IIA/35 | YES | TS |
| CMR131 | Tomato | Yaoundé (V) | IIA/35 | | TS |
| CMR116 | Tomato | Yaoundé (V) | IIA/35 | | TS |
| CMR118 | Tomato | Yaoundé (V) | IIA/35 | | TS |
| CMR47 | Tomato | Foumbot (III) | IIA/35 | | TS |
| CMR69 | Tomato | Bafang (III) | IIA/35 | | TS |
| CMR39 | Tomato | Dschang (III) | IIA/41 | YES | TS |
| CMR121 | Tomato | Yaoundé (V) | IIA/52 | | TS |
| CMR18 | Tomato | Baham (III) | IIIB/1 | | TS |
| CMR24 | Potato | Bamougoum (III) | IIIB/1 | YES | TS |
| CMR34 | Tomato | Baham (III) | IIIB/1 | YES | TS |
| CMR35 | Tomato | Baham (III) | IIIB/1 | YES | TS |
| CMR44 | Potato | Dschang (III) | IIIB/1 | | TS |
| CMR15 | Tomato | Obala (V) | III/29 | YES | TS |
| CMR30 | Tomato | Baham (III) | III/29 | | TS |
| CMR32 | Huckleberry | Dschang (III) | III/29 | | TS |
| CMR36 | Tomato | Baham (III) | III/29 | | TS |
| CMR43 | Potato | Dschang (III) | III/29 | YES | TS |
| CMR50 | Tomato | Mbouda (III) | III/29 | | TS |
| CMR51 | Tomato | Mbouda (III) | III/29 | | TS |
| CMR52 | Potato | Dschang (III) | III/29 | | TS |
| CMR56 | Huckleberry | Foumbot (III) | III/29 | | TS |
| CMR62 | Tomato | Foumbot (III) | III/29 | | TS |
| CMR63 | Tomato | Foumbot (III) | III/29 | | TS |
| CMR75 | Tomato | Melong (IV) | III/29 | | TS |
| CMR76 | Tomato | Melong (IV) | III/29 | | TS |
| CMR78 | Pepper | Melong (IV) | III/29 | YES | TS |
| CMR66 | Huckleberry | Bafang (III) | III/49 | | TS |

(continued on next page)

^a Names of strains in Reunion collection (strains from Cameroon) and in international collections (references). CFBP: Collection Française de Bactéries Phytopathogènes [CFBP], Angers, France; RUN: collection at CIRAD-INRA Reunion.

^b AEZ = agro-ecological zone (Cameroon).

^c Phylotypes were determined by phylotype multiplex-polymerase chain reaction (Pmx-PCR). II/1 strains amplified the race3/biovar2 (R3bv2)-specific band with primer pair 630/631. The phylotype was confirmed by phylogenetic trees based on *mutS*, and sequevars were determined by phylogenetic trees based on *egl* sequence analyses as described in Fegan and Prior (6,7) and Prior and Fegan (28).

^d Pathogenicity tested on potato, tomato, and pepper (see results in Table 4).

^e TS = this study; I = P. Prior, INRA-CIRAD, Reunion Island, unpublished data.

of isolation, and geographical origin, were deposited at the Collection Française de Bactéries Phytopathogènes [CFBP] in Angers, France (Supplemental Table 2).

Pathogenicity tests. A set of seven *R. solanacearum* Cameroon strains and seven reference strains that spanned the genetic diversity reported in this study was tested for pathogenicity on susceptible cultivars of potato (cv. Désirée), tomato (cv. L390), and Pepper (cv. Yolo Wonder) in a growth chamber at $28 \pm 1^\circ\text{C}$ day/ $24 \pm 1^\circ\text{C}$ night, relative humidity of $90 \pm 5\%$ and a 14 h/10 h photoperiod. Bacterial suspensions were prepared in Tris buffer (0.01 M Tris/HCl, pH 7.2) and spectrophotometrically ad-

justed to $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.1$ (approximately 10^8 CFU ml^{-1}). The root system of each plant was wounded with a scalpel; then 5 ml of inoculum per plant was poured on the wounded root system of 10 plants belonging to each of the three susceptible plant species at the three to four fully expanded leaf stage. Ten plants of each species, drenched with 0.01 M Tris buffer (pH 7.2), were used as controls. Symptom development in inoculated plants was monitored every 4 to 5 days for 4 weeks after inoculation. If at least one plant showed typical wilt symptoms, the interaction was classified as compatible (pathogenic).

Table 1. (continued from preceding page)

| Strain ^a | Host | Origin (AEZ) ^b | Phylotype/ sequevar ^c | Pathogenicity tested ^d | Reference ^e |
|--------------------------|-----------|---------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| Reference strains | | | | | |
| R292 | Mulberry | China | I/12 | | (27) |
| JT523 | Potato | Reunion Is. | I/13 | | (27) |
| CFBP765 | Tobacco | Japan | I/15 | | (27) |
| ACH92 | Ginger | Australia | I/16 | | (27) |
| GMI1000 | Tomato | French Guyana | I/18 | | 1 |
| CFBP2968 | Eggplant | Guadeloupe | I/18 | | 1 |
| NCPB3190 | Tomato | Malaysia | I/18 | | 1 |
| CFBP2972 | Potato | Martinique | IIA/35 | | 1 |
| CFBP2957 | Tomato | Martinique | IIA/36 | | 1 |
| CFBP2958 | Tomato | Guadeloupe | IIA/39 | | 1 |
| ICMP7963 | Potato | Kenya | IIA/7 | | (27) |
| K60 | Tomato | USA | IIA/7 | | (27) |
| IPO1609 | Potato | Netherlands | IIB/1 | YES | (27) |
| JT516 | Potato | Reunion Is. | IIB/1 | YES | (27) |
| UW551 | Geranium | Kenya | IIB/1 | YES | (38) |
| CIP10 | Potato | Peru | IIB/25 | YES | (27) |
| NCPB3987 | Potato | Brazil | IIB/28 | YES | (27) |
| MOLK2 | Banana | Philippines | IIB/3 | | (27) |
| UW9 | Heliconia | Costa Rica | IIB/3 | | (27) |
| CFBP1409 | Banana | Honduras | IIB/3 | | (27) |
| CFBP1183 | Heliconia | Costa Rica | IIB/3 | | (27) |
| UW70 | Banana | Colombia | IIB/4 | | (27) |
| UW129 | Banana | Peru | IIB/4 | | (27) |
| UW162 | Banana | Peru | IIB/4 | | (28) |
| CFBP6784 | Anthurium | Martinique | IIB/4 | | (28) |
| A3909 | Heliconia | Hawaii | IIA/6 | | (27) |
| UW21 | Banana | Honduras | IIA/6 | | (28) |
| CFBP734 | Potato | Madagascar | III/19 | | (28) |
| JT525 | Geranium | Reunion Is. | III/19 | YES | (28) |
| NCPB332 | Potato | Zimbabwe | III/22 | | 1 |
| CFBP3059 | Eggplant | Burkina Faso | III/23 | YES | 1 |
| CIP358 | Potato | Cameroon (III) | III/29 | | 1 |
| MAFF301558 | Potato | Japan | IV/8 | | 1 |
| PSi7 | Tomato | Indonesia | IV/10 | | (27) |

Table 2. Characteristics of agro-ecological zones (AEZ) in Cameroon

| AEZ (districts) | Rainfall (mm) | Elevation (m.a.s.l.) ^a | Mean annual temp. (range) |
|---|---------------|-----------------------------------|---------------------------|
| I Sudano - sahelian zone (Garoua) | 500-900 | 250-500 | 28°C (7.7) |
| II High Guinea savannah (Ngaoundéré) | 1,500-1,800 | 500-1,500 | 23°C (6.4) |
| III Western highlands (Bamougoum, Foubot, Baham, Dschang, Mbouda) | 1,800-2,400 | 1,500-2,500 | 21°C (2.2) |
| IV Humid forest (monomodal rainfall) (Melong, Buea) | 2,000-11,000 | 0-2,500 | 26°C (2.8) |
| V Humid forest (bimodal rainfall) (Yaoundé, Okola, Obala, Bafia, Akonolinga) | 1,500-2,000 | 400-1,000 | 25°C (2.4) |

^a Meters above sea level.

DNA typing. Phylotype multiplex-polymerase chain reaction (Pmx-PCR) of the 16S-23S ITS was used to determine the phylotype of each strain based on the methods and hierarchical classification scheme described previously (6). Briefly, Pmx-PCR includes the primers 759/760 (23) as an internal marker to amplify the 280-bp “universal” *R. solanacearum*-specific reference band, plus a set of four phylotype-specific forward primers (Nmult:21:1F: 5'-CGTTGATGAGGCGCG CAATTT-3'; Nmult:21:2F: 5'-AAGTTA TGGACGGTGAAGTC-3'; Nmult:22:1nF: 5'-ATTGCCAAGACGAGAGAAGTA-3'; Nmult:23:AF: 5'-ATTACGAGAGCAATC GAAAGATT-3') with a unique and conserved reverse primer (Nmult:22:RR: 5'-TCGCTTGACCCTATAACGAGTA-3'). This Pmx-PCR produces the following phylotype-specific PCR products: a 144-bp amplicon from phylotype I strains; a 372-bp amplicon from phylotype II strains; a 91-bp amplicon from phylotype III strains; and a 213-bp amplicon from phylotype IV strains. Strains that were classified as phylotype II were further tested using the PCR primer pair 630-F (5'-ATACAG AATTCGACCGGCACG-3') and 631-R (5'-AATCACATGCAATTCGCCTACG-3'), which specifically amplifies a 357-bp fragment from strains in phylotype II, sequevar 1, historically known as R3bv2 (8).

PCR amplification and DNA sequencing of the endoglucanase (*egl*) and DNA repair (*mutS*) genes. Strain genetic diversity and phylogeny were further characterized by comparative analysis of the partial nucleotide sequences of the endoglucanase (*egl*) and the DNA repair protein (*mutS*) genes. PCR amplifications of a 750-bp region of the *egl* gene were performed using the primer pair Endo-F (5'-ATGCATGCCGCTGGTCGCCGC-3') and Endo-R (5'-GCGTTGCCCGGCACGAAC ACC-3') (6). The reaction mixture (50 μl , total volume) contained 1 \times PCR buffer (supplied by the manufacturer), 1.5 mM MgCl_2 , 200 μM of each dNTP, 4 pmol of each primer, a 2 μl volume of a turbid bacterial suspension as template (about 5 ng/ μl), and 1 U of AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA). Reaction mixtures were heated to 96°C for 9 min and then cycled through 30 cycles of 1 min at 95°C , 40 s at 55°C , 2 min at 72°C , with a 10 min final extension at 72°C , and a final hold at 12°C . Amplification of the 758-bp fragment of the *mutS* gene was performed in a total volume of 25 μl containing 1 \times PCR buffer (Promega, Charbonnières-les-Bains, France), 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM of each dNTP, 0.8 μM DMSO, 1.25 U of *Taq* Polymerase (Promega), 9 pmol of the primers *mutS*-RsF.1570 (5'-ACAGCGCCTTGAGCCGGT ACA-3') and *mutS*-RsR.1926 (5'-GCT GATCACCGGCCCAACAT-3'), and 2 μl of a turbid bacterial suspension as template (about 5 ng/ μl). Reaction mixtures were

first heated to 96°C for 5 min, and then cycled through 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 66°C, and 1.5 min at 72°C, with a 5-min final extension at 72°C (27). All

PCR amplifications were performed using an MJ PTC100 thermocycler (MJ Research, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Samples (5 µl) of PCR reaction

/DLi0T t0d1T 00X-1X L670L00T

mixtures were resolved on a 2% Tris-acetate-EDTA agarose electrophoresis gel, and PCR products were revealed by staining DNA in 0.5 µg·ml⁻¹ ethidium bromide. PCR products were sent to MWG-biotech (Ebersberg, Germany) for purification and sequencing of both strands. For both *egl* and *mutS* genes, PCR primers used to amplify partial sequence of these genes were also used as sequencing primers.

Sequence analysis and construction of phylogenetic trees. The partial sequences of the chromosomally located housekeeping gene *mutS* and the megaplasmid-located virulence gene *egl* were analyzed using the ARB Software Environment (19) (<http://www.arb-home.de/>). Sequences were manually aligned using the ARB sequence editor. Evolutionary relationships between sequences were analyzed using the three major phylogenetic approaches offered by the ARB Software: (i) using the algorithm of Jukes and Cantor (16), phylogenetic trees were constructed from the genetic distance data by using the neighbor-joining (NJ) method (32) with 5,000 bootstrap resamplings of the data to test the tree topologies; (ii) maximum likelihood (ML) methods using the FastDNAmI program; and (iii) the maximum parsimony (MP) methods using the Phylip DNAPARS package implemented by the ARB software. From the pool of *mutS* and *egl* sequences included in this study (77 and 76 sequences, respectively), representative reference strains were identified, and sequences from newly described strains were deposited into the GenBank database.

RESULTS

***R. solanacearum* strain collection.** A total of 110 *R. solanacearum* strains were recovered from wilted tomato, sweet and hot pepper, potato, huckleberry, amaranth, and sesame plants (Table 1). Bacterial wilt is widely distributed in Cameroon, but disease incidence and severity were highest in AEZ V (Yaoundé, lowlands) and AEZ III (Bafoussam, highlands), which are also the main vegetable cropping areas of Cameroon. The phylotyping results of the 110 *R. solanacearum* strains by AEZ are reported in Table 3. From these 110 strains, a set of 44 representative strains collected in Cameroon was selected for phylogenetic analysis (Table 1), including strains from all phylotypes and most of the hosts. No *R. solanacearum* strains were obtained from AEZ I (Fig. 1).

PCR-based identification and characterization of *R. solanacearum* strains. Multiplex PCR analyses demonstrated that three of the four *R. solanacearum* phylotypes were present in Cameroon: the Asian phylotype I, the American phylotype II, and the African phylotype III (Table 4). Strains of phylotype I constituted the largest group (45.5% of the 110 strains). Strains of phylotype II represented 35% of the collection. Among these phylotype II

Table 3. Phylotype distribution of *Ralstonia solanacearum* strains collected in Cameroon within agro-ecological zones (AEZ) based upon DNA typing using phylotype multiplex-polymerase chain reaction (PCR) and the race 3/biovar 2 (R3bv2)-specific 630/631 PCR tests

| AEZ | No. of strains | | | | Total no. of strains |
|--------------------------|---|----------------------------------|------------------|---|----------------------|
| | Phylotype I | Phylotype II subcluster/sequevar | | Phylotype III | |
| | | A/non-R3bv2 | B/1 (R3bv2) | | |
| II | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| III | 0 | 11 | 5 | 14 | 30 |
| IV | 0 | 1 | 0 | 5 | 6 |
| V | 50 | 22 | 0 | 1 | 73 |
| Total no. of strains (%) | 50 (45.5) | 35 (31.8) | 5 (4.5) | 20 (18.2) | 110 |
| Hosts of isolation | Tomato Potato Pepper Huckleberry Amaranth | Tomato Pepper Huckleberry | Tomato Potato | Tomato Potato Pepper Huckleberry | |

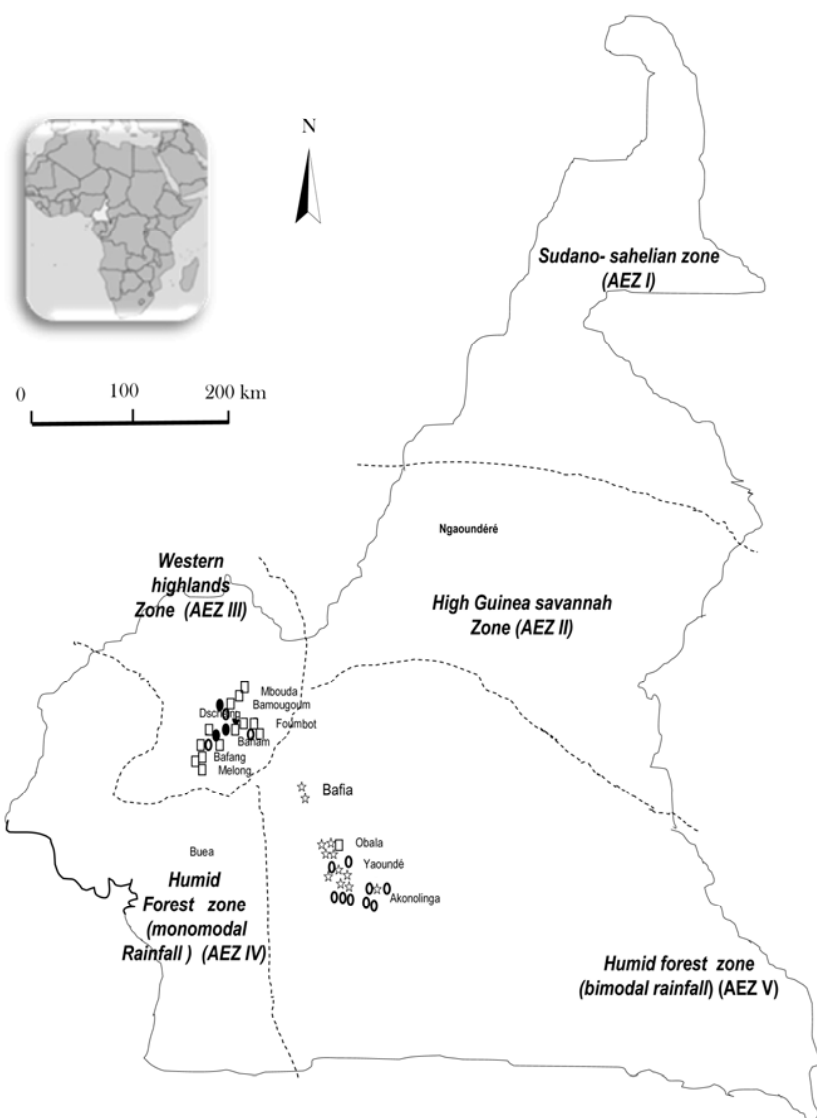


Fig. 1. Map of Cameroon showing the five agro-ecological zones and the locations where *Ralstonia solanacearum* strains of phylotype I (stars), IIA (open circles), IIB (closed circles), and III (open squares) were sampled.

strains, 5% were identified as sequevar 1 (R3bv2) because the characteristic R3bv2-specific 304-bp band was amplified from their DNA using the 630/631 primer pair. Strains of African phylotype III represented only 18% of the 110 collected isolates.

Pathogenicity. All Cameroon strains tested ($n = 7$) were pathogenic on potato (Table 4). Plants developed symptoms approximately 5 days after inoculation, showing a typical leaf margin rolling-up and epinasty, followed by a generalized and characteristic wilt. All strains except the reference R3bv2 strain IPO1609 (13,39) were pathogenic to tomato. Cameroon strains CMR15 and CMR43, as well as reference strains IPO1609, CIP10, and NCPB3987, were classed as not pathogenic to pepper because no symptoms developed 4 weeks after inoculation.

Phylogenetic analysis. Partial *egl* and *mutS* gene sequences were generated from a set of representative strains from Cameroon ($n = 44$) and compared with those from *R. solanacearum* reference strains covering the known genetic diversity within the four phylotypes (6,27). Trees constructed with maximum likelihood, parsimony, and distance NJ phylogenetic approaches were totally congruent; therefore, we present only NJ phylogenetic trees with bootstrap values (Figs. 2 and 3). Trees constructed with *egl* and *mutS* sets of sequences were in general agreement with one difference in topology: phylotype III was most closely related to phylotype II in the *egl*-derived tree, while it was more closely related to phylotype I in the *mutS* tree. Apart from this different branching order, trees constructed using the two different sequences showed similar branching patterns clearly partitioning the four phylotypes as previously described (6). The reference strains from phylotypes I, II, III, and IV clustered separately with high bootstrap values.

The 44 representative strains collected in Cameroon were classified into phylotypes according to Pmx-PCR results (Table 1).

Phylotype I strains were isolated from various hosts including tomato, *Solanum nigrum* (CMR96 and CMR134), and *Amaranthus* spp. (CMR111) produced in the hot and humid lowland AEZ V. These strains were closely related according to both *egl* and *mutS* sequence analyses.

Phylotype II strain DNA sequences resolved into two main branches: subclusters A and B (7). Within subcluster A, all strains isolated from tomato and huckleberry had *egl* sequences differing by less than 1% from the *egl* sequence of sequevar 35 reference strain CFBP2972 (P. Prior, INRA-CIRAD, Réunion, unpublished data). They were thus assigned phylotype IIA sequevar 35 (IIA/35). Within subcluster B, all strains were indistinguishable from reference sequevar 1 strains IPO1609 (The Netherlands) and JT516 (Reunion Island) (27). These phylotype IIB/1 strains were all isolated in the cool highlands of AEZ III from potato plants with brown rot symptoms (CMR24, CMR44) and from wilting tomato plants (CMR18, CMR34, CMR35).

Phylotype III strains from Cameroon fell, for most of these, in a subgroup near the reference strain CIP358, previously typed as phylotype III/29 (P. Prior, INRA-CIRAD, Réunion, unpublished data). The strain CMR66 was more closely related to the phylotype III/23 reference strain CFBP3059 from Burkina Faso (6). No strains collected in Cameroon in this study belonged to phylotype IV, the Indonesian cluster of *R. solanacearum*.

Geographic distribution of phylotypes in Cameroon. The distribution of phylotypes within the agro-ecological zones visited in this study reflected some epidemiological traits of *R. solanacearum* strains (particularly regarding virulence/temperature relationships) (Table 3). *R. solanacearum* was mainly isolated in the humid lowland AEZ V and in the highland AEZ III. Phylotype III strains were

found in AEZ III, IV, and V, with a majority collected in AEZ III, which is a major potato and tomato cropping area. Phylotype II strains were found in AEZ II, III, and IV; however, phylotype IIB strains were more prevalent in the highlands of West Cameroon (AEZ III), whereas phylotype IIA strains, isolated from various hosts, were distributed among all AEZs visited. All phylotype I strains were collected in the lowland AEZ V (see Figure 1 and Table 2 for AEZ characteristics).

DISCUSSION

Bacterial wilt, caused by *R. solanacearum*, was observed in the major vegetable cropping areas of highland and lowland regions surveyed in Cameroon. In this country, farmers from all the regions visited were familiar with bacterial wilt, called “Djom-djom” disease in the Obala area (AEZ V), literally translated as “sleep-sleep” referring to the sudden wilt of tomatoes; “Sudden-death” in Baham (AEZ III); “Water-disease” in Fombot (AEZ III) in the highlands of West Cameroon; and “Direct-attack” by tomato growers in Buea (AEZ IV) on the slopes of Mount Cameroon. One hundred and ten strains of *R. solanacearum* were collected from the major cash and/or subsistence crops, and 44 representative strains were positioned in the global phylogenetic scheme of the *R. solanacearum* species complex (6), along with 33 reference strains. These analyses revealed a high genetic diversity among the pathogen strains collected in this country. Phylotype assignment by Pmx-PCR was perfectly congruent with phylogenetic positioning based on sequences of *egl* and *mutS* genes.

Cameroon strains of *R. solanacearum* belonged to three of the four previously described phylotypes (6): I, II, III. The presence in Africa of these three groups was previously known (5), but our study is the first to describe the distribution of the three phylotypes in a single Central Afri-

Table 4. Pathogenicity of selected *Ralstonia solanacearum* strains on potato, tomato, and pepper

| Strain ^a | Host | Origin ^b | Phylotype and subcluster ^c | Pathogenicity on | | |
|---------------------|-------------|---------------------|---------------------------------------|------------------|--------|--------|
| | | | | Potato | Tomato | Pepper |
| CMR134 | Huckleberry | Bafia (V) | I | + | + | + |
| CMR39 | Tomato | Dschang (III) | IIA | + | + | + |
| CMR120 | Tomato | Yaoundé (V) | IIA | + | + | + |
| CMR34 | Tomato | Baham (III) | IIB | + | + | + |
| JT516 | Potato | Reunion Is. | IIB | + | + | + |
| UW551 | Geranium | Kenya | IIB | + | + | + |
| IPO1609 | Potato | Netherlands | IIB | + | - | - |
| NCPB3987 | Potato | Brazil | IIB | + | + | - |
| CIP10 | Potato | Peru | IIB | + | + | - |
| CMR43 | Potato | Dschang (III) | III | + | + | - |
| CMR15 | Tomato | Obala (V) | III | + | + | - |
| CMR78 | Pepper | Melong (IV) | III | + | + | + |
| JT525 | Geranium | Reunion Is. | III | + | + | + |
| CFBP3059 | Eggplant | Burkina Faso | III | + | + | + |
| Control (water) | | | | - | - | - |

^a Strains from Cameroon (CMR) and references.

^b District (agro-ecological zone) in Cameroon or country of origin.

^c Phylotypes and subclusters were determined by *egl* and *mutS* sequence analyses.

can country. Phylotype I strains of *R. solanacearum* represented almost half of the collected strains and were over-represented in AEZ V of Yaounde, a warm and humid lowland region, especially in the rainy season of March (Table 4). This result confirms previous reports on phylotype I (ex-biovar 3) strains originating from Southern Africa (24,25). As expected from this group, they were found in several host species including tomato, potato, pepper, huckleberry, and amaranth. Phylotype I strains may thus be considered the major bacterial wilt constraint for vegetable crops in the lowland bimodal humid forest region of Cameroon (AEZ V; Yaounde, Akonolinga, Obala, Bafia).

In contrast, phylotype III and phylotype IIB (R3bv2) strains were preferentially isolated from AEZ III, a highland cropping area with a temperate climate (Baham,

Bafoussam, Bamougoum, Dschang, Fombot). Strains from phylotype IIA were found in both AEZ III and AEZ V. A further survey including a systematic collection sampling method may help to refine and validate these geographic distribution patterns.

Among the phylotype II strains of *R. solanacearum*, we noted differing host range and geographical distributions for IIA and IIB strains. Phylotype IIA strains were isolated from, and prevalent on, tomato and huckleberry crops in all regions sampled, with a majority of the strains originating from the lowland areas. Phylotype IIB/1 (R3bv2) strains were only isolated from potato and tomato in the highland AEZ III, the major potato cropping region. These strains, which are considered to be near-clonal, are hypothesized to have adapted (coevolved) with potato (10). This

study confirms that strains in phylotype IIB/1 have a host range that is not limited to potato under natural African highland and tropical conditions. This finding is of major concern for tomato growers in Cameroon, as well as in other African countries where phylotype II/1 strains (R3bv2) have been reported, including Nigeria (35), Uganda, Rwanda, and Tanzania (5), Ethiopia (18), and South Africa (5,9). Indeed, some phylotype IIB/1 strains are highly virulent on the most commonly used wilt-resistant tomato lines (2).

We show here that phylotype III strains of Cameroon have the same host range (potato and tomato) and the same cool highland environment (AEZ III) as phylotype IIB/1 strains, and caused the same brown rot-like syndrome on potato. Although indistinguishable on the basis of symptom development, disease severity in

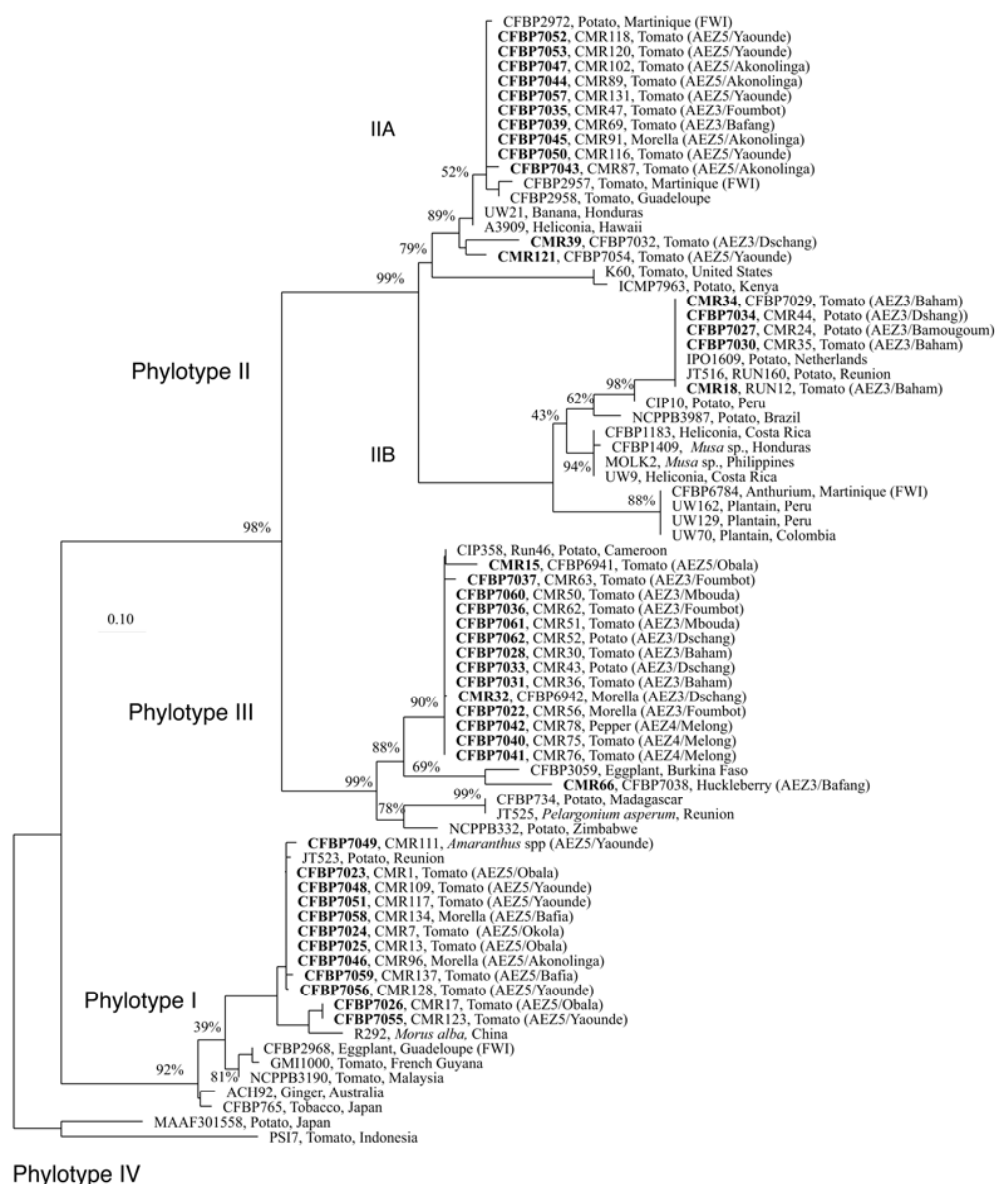


Fig. 2. Phylogenetic neighbor-joining tree based on the partial endoglucanase (*egl*) gene sequences of strains from Cameroon and *Ralstonia solanacearum* species complex reference strains. The number at each node is the bootstrap value (5,000 resamplings), and significant bootstrap values less than 100% are indicated at each node. Scale bar represents 1 nucleotide substitution per 100 nucleotides.

potato, and prevalence in cool potato growing areas, *R. solanacearum* strains that cause wilt in potato in the highland areas of Cameroon should be referred to as (i) the African brown rot group, composed of phylotype III strains, and (ii) the Andean brown rot group, composed of phylotype IIB/1 (R3bv2) strains that most likely were introduced through imported latently infected potato tubers. The presence of these two phylogenetically distinct but epidemiologically congruent pathogen groups in the West African highlands must be taken into account in the development of control strategies, including diagnostic tools and especially regional disease resistance breeding programs.

Phylogenetic analysis of *R. solanacearum* strains collected in Cameroon and comparisons with reference strains from neighboring countries revealed that the recently described phylotype III (6), formerly described as the "African biovar 1" strains (24,25), encompasses broad vari-

ability. Three subgroups with strong bootstrap support were observed, distinguishing (i) the southern Africa and Indian Ocean strains (III/19 and II/21), containing the reference strain NCPB332 (from Zimbabwe), and phylotype III/19 reference strains CFBP734 (Madagascar) and JT525 (Reunion Island), (ii) the Central Africa strains, mostly represented in Cameroon (III/29), and (iii) a subgroup still poorly investigated, containing the strain CMR66, and the phylotype III/23 reference strain CFBP3059 from Burkina Faso (6). We thus tentatively propose further subdivision of phylotype III into three clusters, awaiting further data from additional African strains for confirmation. Additional pan-African studies in southern, central, and northern Africa should reveal the genetic variability that remains to be described within phylotype III.

As a follow-up to this study, a typical lowland phylotype III strain, CMR15 (CFBP6941), is being completely se-

quenced to investigate the conserved and specific gene repertoires of these hitherto poorly described strains within the *R. solanacearum* species complex.

This study provides the first comprehensive information on genetically diverse strains of *R. solanacearum* in the Central African country of Cameroon. A recent survey in Ethiopia (18), although based on biovar classification, suggests that the diversity we found in Cameroon is not unique in Africa. The relationships between the wide genetic diversity and strain virulence phenotypes demands further investigation. Understanding the biological implications of such broad genetic diversity is critically important for the development of locally adapted strategies for bacterial wilt resistance breeding in Cameroon and other African countries that share similar agro-ecological environments.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grants from the French Ministry of Foreign Affairs (French Embassy in Yaoundé) and from the Delegation for International Scientific Exchanges, CIRAD. We thank M. Fegan, A. Guidot, and L. Gagnevin for critically reviewing the manuscript.

LITERATURE CITED

- Busolo-Bulafu, C. M. 1998. Resistance to bacterial wilt in Uganda. Pages 306-308 in: Bacterial wilt disease: Molecular and ecological aspects. P. Prior, C. Allen, and J. G. Elphinstone, eds. INRA Editions, Paris.
- Carneille, A., Prior, P., Kodja, H., Chiroleu, F., Luisetti, J., and Besse, P. 2006. Evaluation of resistance to race 3, biovar 2 of *Ralstonia solanacearum* in tomato germplasm. J. Phytopathol. 154(7-8):398-402.
- Cook, D., Barlow, E., and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: Detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. Mol. Plant-Microbe Interact. 2:113-121.
- Coutinho, T., Roux, J., Riedel, K., Terblanche, J., and Wingfield, M. 2000. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on eucalypts in South Africa. - Erstnachweis einer durch *Ralstonia solanacearum* verursachten Bakterienwelke an Eukalyptus in Sndafrika. For. Pathol. (Germany) 30(4).
- Elphinstone, J. G. 2005. The current bacterial wilt situation: A global overview. Pages 9-28 in: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward, eds. American Phytopathological Society, Saint Paul, MN.
- Fegan, M., and Prior, P. 2005. How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex". Pages 449-462 in: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward, eds. American Phytopathological Society, Saint Paul, MN.
- Fegan, M., and Prior, P. 2006. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. Australas. Plant Pathol. 35:93-101.
- Fegan, M., Taghavi, M., Sly, L. I., and Hayward, A. C. 1998. Phylogeny, diversity and molecular diagnostics of *Ralstonia solanacearum*. Pages 19-33 in: Bacterial Wilt Disease - Molecular and Ecological Aspects. P. Prior, C. Allen, and J. Elphinstone, eds. Springer, INRA Editions, Berlin.

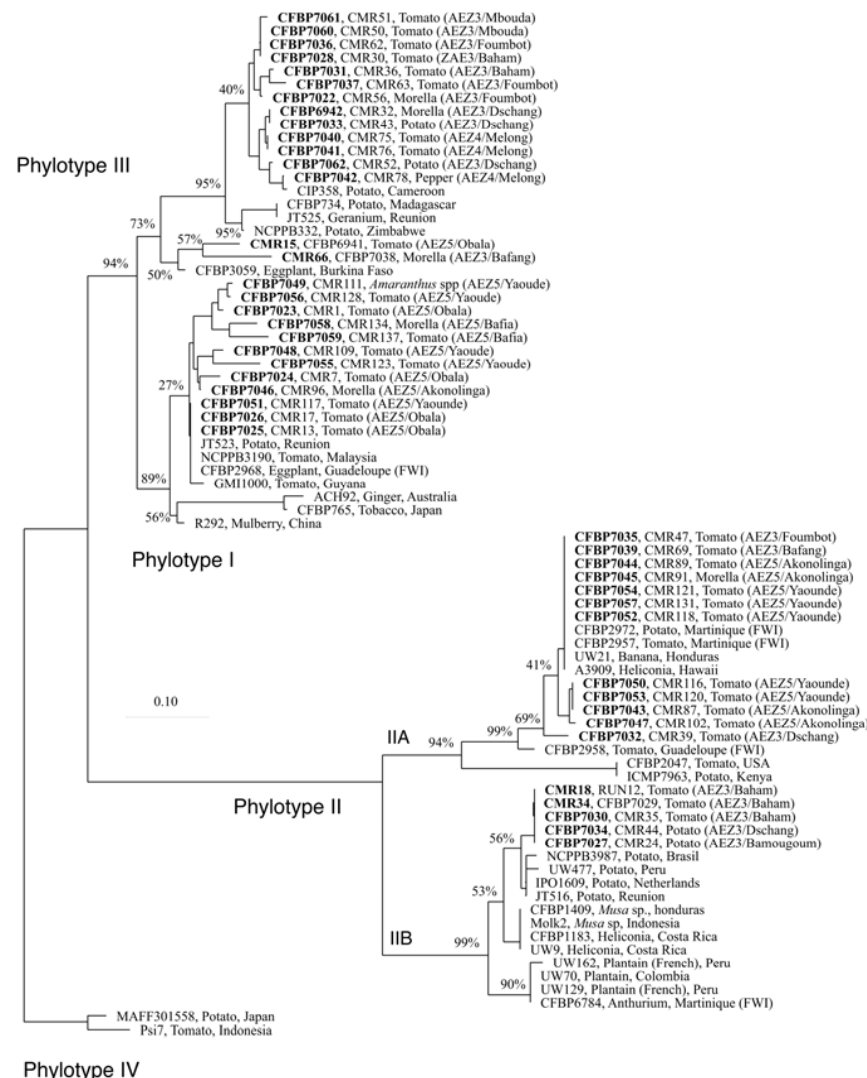


Fig. 3. Phylogenetic neighbor-joining tree based on partial sequences of the DNA repair *mutS* gene from strains from Cameroon and *Ralstonia solanacearum* species complex reference strains. The number at each node is the bootstrap value (5,000 resamplings), and significant bootstrap values less than 100% are indicated at each node. Scale bar represents 1 nucleotide substitution per 100 nucleotides.

9. Fouche, W. J., Poussier, S., Trigalet, D. D., Berger, D., and Coutinho, T. 2006. Molecular identification of some African strains of *Ralstonia solanacearum* from eucalypt [Eucalyptus] and potato [Solanum tuberosum]. J. Gen. Plant Pathol. (Japan) 72(6):369-373.
10. Gillings, M. R., and Fahy, P. 1994. Genomic fingerprinting: Towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. Pages 95-112 in: Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. A. C. Hayward and G. L. Hartman, eds. CAB International, Wallingford, UK.
11. Gockowski, J., Mbazo'o, J., Mbah, G., and Fouda Moulende, T. 2003. African traditional leafy vegetables and the urban and peri-urban poor. Food Policy 28:221-235.
12. Grimault, V., and Prior, P. 1994. Grafting tomato cultivars resistant or susceptible to bacterial wilt: Analysis of resistance mechanisms. J. Phytopathol. 141(3):330-334.
13. Guidot, A., Prior, P., Schoenfeld, J., Carrere, S., Genin, S., and Boucher, C. 2007. Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. J. Bacteriol. 189(2):377-387.
14. Hanson, P. M., Wang, J.-F., Lucardo, O., Hanudin, S. Y., Hartman, G. L., Lin, Y.-C., and Chen, J.-T. 1996. Variable reactions of tomato lines to bacterial wilt evaluated at several locations in South-East Asia. HortScience 31:143-146.
15. Ji, P., Momol, M. T., Olson, S. M., Pradhanang, P. M., and Jones, J. B. 2005. Evaluation of thymol as biofumigant for control of bacterial wilt of tomato under field conditions. Plant Dis. 89:497-500.
16. Jukes, T. H., and Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules. Pages 21-132 in: Mammalian Protein Metabolism. H. N. Munro, ed. Academic Press, New York.
17. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetracycline medium. Phytopathology 44:693-695.
18. Lemessa, F., and Zeller, W. 2007. Isolation and characterisation of *Ralstonia solanacearum* strains from Solanaceae crops in Ethiopia. J. Basic Microbiol. 47(1):40-49.
19. Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richetr, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüssman, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., and Schleifer, K. H. 2004. ARB: A software environment for sequence data. Nucleic Acids Res. 32(4):1363-1371.
20. Madden, L. V., and Wheelis, M. 2003. The threat of plant pathogens as weapons against U.S. crops. Annu. Rev. Phytopathol. 41:155-176.
21. Michel, V. V., and Mew, T. W. 1998. Effect of a soil amendment on survival of *Ralstonia solanacearum* in different soils. Phytopathology 88:300-305.
22. Michel, V. V., Wang, J.-F., Midmore, D. J., and Hartman, G. L. 1997. Effects of intercropping and soil amendment with urea and calcium oxide on the incidence of bacterial wilt of tomato and survival of soil-borne *Pseudomonas solanacearum* in Taiwan. Plant Pathol. 46:600-610.
23. Opina, N., Tavner, F., Hollway, G., Wang, J.-F., Li, T.-H., Maghirang, R., Fegan, M., Hayward, A. C., Krishnapillai, V., Hong, W. F., Hollway, B. W., and Timmis, J. 1997. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). Asia Pacific J. Mol. Biol. Biotechnol. 5:19-30.
24. Poussier, S., Trigalet-Demery, D., Vandewalle, P., Goffiner, B., Luisetti, J., and Trigalet, A. 2000. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the hrp region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. Microbiology 146:1679-1692.
25. Poussier, S., Vandewalle, P., and Luisetti, J. 1999. Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hrp gene region. Appl. Environ. Microbiol. 65(5):2184-2194.
26. Pradhanang, P. M., Ji, P., Momol, M. T., Olson, S. M., Mayfield, J. L., and Jones, J. B. 2005. Application of acibenzolar-S-methyl enhances host resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum*. Plant Dis. 89:989-993.
27. Prior, P., and Fegan, M. 2005. Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. Pages 127-136 in: Proc. 1st Int. Sympos. Tomato Dis. T. Momol and J. B. Jones, eds. ISHS-Acta Hort.
28. Prior, P., and Fegan, M. 2005. Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. Acta Hort. 695:127-136.
29. Prior, P., Grimault, V., and Schmit, J. 1994. Resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) in tomato: Present status and prospects. Pages 209-224 in: Bacterial wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. A. Hayward and G. L. Hartman, eds. CAB International, Wallingford, UK.
30. Ran, L. X., Liu, C. Y., Wu, G. J., Loon, L. C. v., and Bakker, P. A. H. M. 2005. Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China. Biol. Control 32(1):111-120.
31. Robertson, A. E. 1998. Factors affecting the population of *Ralstonia solanacearum* in a naturally infested field planted to tobacco. Pages 369-373 in: Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects. P. Prior, C. Allen, and J. G. Elphinstone, eds. INRA Editions, Paris.
32. Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4:406-425.
33. Sanchez Perez, A., Mejia, L., Fegan, M., and Allen, C. 2008. Diversity and distribution of *Ralstonia solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection. Plant Pathol. 57:1-12.
34. Schönfeld, J., Gelsomino, A., Overbeek, L. v., Gorissen, A., Smalla, K., and Elsas, J. v. 2003. Effects of compost addition and simulated solarisation on the fate of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 and indigenous bacteria in soil. FEMS Microbiol. Ecol. 43:63-74.
35. Smith, J. J., Offord, L. C., Holderness, M., and Saddler, G. S. 1995. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. Appl. Environ. Microbiol. 61:4263-4268.
36. Smith, J. J., Offord, L. C., Kitaba, G. N., Murimi, Z. K., Trigalet, A., and Saddler, G. S. 1998. The development of biological control agents against *Ralstonia solanacearum* race 3 in Kenya. Pages 306-308 in: Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects. P. Prior, C. Allen, and J. Elphinstone, eds. INRA Editions, Paris.
37. Swanpoel, A. E., and Young, B. W. 1988. Characteristics of South African strains of *Pseudomonas solanacearum*. Plant Dis. 72:403-405.
38. Swanson, J. K., Yao, J., Tans-Kersten, J., and Allen, C. 2005. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium. Phytopathology 95:136-143.
39. van Elsas, J. D., Kastelein, P., van Bekkum, P., van der Wolf, J. M., de Vries, P. M., and van Overbeek, L. S. 2000. Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates. Phytopathology 90:1358-1366.
40. Wang, J.-F., Chen, N.-C., and Li, H.-M. 1998. Resistance sources of bacterial wilt in eggplant (*Solanum melongena*). Pages 284-289 in: Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects. P. Prior, C. Allen, and J. Elphinstone, eds. Springer, INRA editions, Berlin, Paris.
41. Wang, J.-F., Hanson, P., and Barnes, J. A. 1998. Worldwide evaluation of an international set of resistant sources to bacterial wilt in tomato. Pages 269-275 in: Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects. P. Prior, C. Allen, and J. G. Elphinstone, eds. Springer-Verlag, Berlin.
42. Wydra, K., and Dannon, E. 2006. Silicon as inducer of resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum*. Bull. OILB/SROP 29:91-96.
43. Yoon, J. Y., Green, S. K., Tschanz, A. T., Tsou, S. C. S., and Chang, L. C. 1989. Pepper improvement for the tropics: Problems and the AVRDC approach. Pages 86-98 in: Tomato and pepper production in the tropics- Proc. Int. Sympos. Integrated Manag. Practices. S. K. Green, T. D. Griggs, and B. T. McLean, eds. AVRDC, Tainan, Taiwan.

Conclusions partielles

Cette étude de cas concerne la situation du flétrissement bactérien au Cameroun et elle a sans doute valeur de référence pour l'ensemble du continent Africain, car c'est la première étude exhaustive publiée sur la diversité génétique et la phylogénie. À partir de la collecte de 110 isolats de *R. solanacearum* lors d'une prospection réalisée par Mahbou et Prior (Mahbou Somo Toukam, 2010), 44 souches d'entre elles ont été positionnées dans un arbre phylogénétique avec 33 souches de références internationales couvrant la diversité génétique connue dans le complexe d'espèces.

Nos travaux sur ces souches camerounaises révèlent une grande diversité des isolats provenant de grandes cultures ou de cultures vivrières, et la phylogénie obtenue en phylotypes et sequevars confirme les précédentes études à ce sujet. Ainsi, les trois phylotypes (I, II et III) que nous nous attendions à caractériser ont été retrouvés sur l'ensemble du territoire prospecté, avec une majorité de souches de phylotype I qui provenaient de zones chaudes et humides, de basses altitudes. Aucune souche indonésienne de phylotype IV n'a été repérée (une introduction malheureuse pouvait être envisagée). Inversement, les souches pomme de terre (Brown rot) de phylotype IIB-1 et les souches de phylotypes III ont toutes été isolées de zones de tempérées de hautes altitudes et uniquement de plant de pomme de terre et de tomate. Concernant les souches de phylotype IIA, elles ont été isolées dans les deux types de zones (plaines et hauts plateaux) et majoritairement de la Tomate et de l'Airelle (*Vaccinium spp.*). Les études phylogénétiques portées sur le phylotype III permettent d'anticiper une partition de ces souches en 3 groupes distincts : les souches d'Afrique du Sud et Océan Indien, les souches d'Afrique Centrale et quelques souches marginales. Naturellement, seule une vaste étude portant sur une collection importante de souches pan-africaine permettra de trancher sur une éventuelle structuration des populations dans ce phylotype.

Il apparaît donc que les souches de phylotype III convergent phénotypiquement avec les souches dites « froides » Brown rot de phylotype IIB-1 et apparaît naturel de les référer comme des « African Brown rot » pour les différencier du second groupe d'émergence représenté par les « Andean Brown rot », souches de phylotypes IIB-1 et IIB-2. Comme rapporté précédemment, les souches de *R. solanacearum* du phylotype III sont endémiques des régions africaines et de l'Océan Indien, mais compte tenu des échanges internationaux qui vont en s'intensifiant, il est envisageable que ces souches puissent représenter, en Europe et dans les pays tempérés, une nouvelle menace pour les cultures maraîchères.

À partir de cette étude de cas, nous avons décidé de séquencer le génome de la souche CMR15 (projet financé par Génoscope), car c'était la seule souche de phylotype III isolée dans un environnement tropical de plaine (Yaoundé). Nous avons alors un argument épidémiologique permettant d'anticiper que cette souche pourrait utilement faire partie de panels de souches couvrant l'ensemble des phylotypes dans la perspective d'analyses comparatives du pouvoir pathogène à des températures chaudes.

CHAPITRE 3 : DIVERSITE GENETIQUE ET PHENOTYPIQUE DANS LE PHYLOTYPE II

CHAPITRE 3

DIVERSITE GENETIQUE ET PHENOTYPIQUE

DANS LE PHYLTYPE II

Historiquement, le flétrissement bactérien est une maladie des plantes qui frappe gravement les régions tropicales et subtropicales de plaines, à l'exception des souches Brown rot des hauts plateaux andins, encore reconnues dans la littérature comme appartenant à la race 3 et au Biovar 2, et désormais classée dans le phylotype IIB-1. Ces souches sont principalement pathogènes de la pomme de terre, de la tomate et des ornementales (géranium, anthurium, pothos), et sont extrêmement destructives dans les zones de production d'altitude en Amérique latine, mais aussi en Afrique, dans l'Océan Indien et en Asie (Chine, Taiwan...) où il est communément accepté qu'elles y ont été introduites à la faveur de la mondialisation des échanges de tubercules semences. Leur apparition en Europe était donc malheureusement prévisible et ces souches causent de sérieux problèmes sanitaires et de quarantaine (Elphinstone, 2005; Janse, 1996). Toutes les études de diversité génétique sur ces souches de phylotype IIB-1 signalent une population quasi clonale (Hayward, 1991; Janse, 1996; Timms-Wilson, Bryant, *et al.*, 2001; van der Wolf, Bonants, *et al.*, 1998). Les travaux français ont confirmé ce point et les analyses sont congruentes lorsqu'elles portent sur 47 souches de phylotype IIB-1 où il n'a été décelé qu'une très faible diversité génétique (Poussier, Trigalet-Demery, *et al.*, 2000). Bien que clonal, ce cluster rassemble des souches d'horizons géographiques très différents : Afrique, Amérique, Asie, Europe et Océanie (Poussier, Vandewalle, *et al.*, 1999). La récente découverte des souches de phylotype III, endémiques à l'Afrique et à l'Océan Indien et qui convergent phénotypiquement avec les souches Brown rot de phylotype IIB-1 (Chapitre 2), pose de sérieuses interrogations quant à leur potentiel de nuisance et aucune donnée expérimentale n'était disponible sur leur présence en Europe (Mahbou Somo Toukam, Cellier, *et al.*, 2009).

Ainsi face aux nombreux problèmes sanitaires posés par *R. solanacearum*, et compte tenu de la circulation importante de certaines souches au plan mondial, il devenait urgent d'estimer le degré de diversité des souches de *R. solanacearum*, tant phylogénétique que phénotypique, existant dans les souches isolées soit de foyers infectieux, soit de contrôle à l'entrée de la zone Euro et dans le bassin méditerranéen. Non pas que cela n'avait jamais été entrepris, mais surtout j'ai déployé des outils moléculaires qui n'avaient jusqu'alors pas été utilisés dans les travaux de référence. Toutes les souches que nous avons testées ont été typées sur la base du schéma de classification en phylotype/sequevars puis leur position

phylogénétique a été assignée sur la base de l'analyse du polymorphisme de séquence du gène de l'endoglucanase (*egl*). Compte tenu de l'importance des approches en génomique et postgénomique qui seront présentées ultérieurement, il était de la plus grande importance de s'attacher à revisiter les connaissances préétablies sur les différents pathotypes, en particulier pour ce qui concerne les souches appartenant au phylotype II. En effet, ce phylotype a révélé la plus large base génétique et phénotypique dans ce complexe d'espèces et abrite deux écotypes dont le pathotype est rapporté par la littérature comme divergent : les souches Brown rot adaptées aux températures froides et à la pomme de terre ; et les souches provoquant la Moko, adaptées aux températures chaudes et aux *Musaceae*. L'originalité de la description s'est appuyée sur des tests de pathogénie de grande échelle sur pomme de terre, puis sur une collection de ressources génétiques optimisées en tomate et aubergine, issues de précédents travaux (Carmeille, Caranta, *et al.*, 2006; Carmeille, Prior, *et al.*, 2006; Lebeau, Daunay, *et al.*, 2010; Mahbou Somo Toukam, Cellier, *et al.*, 2009).

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue internationale *Phytopathology*.

Cellier, G., & Prior, P. (2010). Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains pathogenic to potato. *Phytopathology*, 100(10), 1250-1261.

Deciphering Phenotypic Diversity of *Ralstonia solanacearum* Strains Pathogenic to Potato

G. Cellier and P. Prior

First and second authors: CIRAD UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical, CIRAD-Université de la Réunion, Pôle de Protection des Plantes, 7, chemin de l'Irat, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France; first author: AgroParisTech, ENGREF, 19 avenue du Maine, Paris F-75732, France; and second author: INRA, Département Santé des Plantes et Environnement.
Accepted for publication 20 July 2010.

ABSTRACT

Cellier, G., and Prior, P. 2010. Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains pathogenic to potato. *Phytopathology* 100:1250-1261.

Based on the phylotype classification, we questioned how genetically and phenotypically diverse strains of *Ralstonia solanacearum* pathogenic to potato may be. We studied 129 European and Mediterranean strains along with 57 reference strains known to cover genetic diversity in this species. Phylogeny analysis was done on endoglucanase gene sequences. Pathogenicity to potato, tomato, and eggplant was established at 24 to 30°C and 15 to 24°C, whereas tests on banana were conducted at 24 to 30°C. The ability to cause wilt on species of *Solanaceae* was shared by strains in all four phylotypes. Brown rot phylotypes IIB-1 and IIB-2 and

phylotype IIB-27 established latent infections in banana, and Moko disease-causing phylotypes IIA-6, IIB-3, and IIB-4 were virulent to susceptible potato and tomato, addressing the question of host adaptation mechanisms, which may have undergone a similar bottleneck evolution. Cold-tolerance ability is only shared on species of *Solanaceae* among brown rot phylotype IIB-1, which gathered the majority of European and Mediterranean strains. We surveyed strain LNPV24.25 as the first report of an emerging phylotype IIB-4NPB strain in France. These findings showed that pathogenicity traits of genetically identified strains still need to be understood, especially in the perspective of post-genomics comparative analysis, to understand bacterial speciation in the *R. solanacearum* species complex.

Ralstonia solanacearum is a soilborne plant-pathogenic β -proteobacterium with a wide host range and geographic distribution (17). Plants in at least 54 botanical families are affected in tropical and subtropical midland regions of the world (17–19). Strains within the species are heterogeneous and form part of a species complex (10). Bacterial wilt (BW) caused by *R. solanacearum* (Smith) (42) and recent introduction of brown rot strains in 14 of 27 Europe member states where outbreaks of brown rot have been reported, including The Netherlands, England, Belgium, and France (9,14,20), pose a serious threat to most cash and subsistence crops in the family *Solanaceae*, especially potato, tomato, sweet pepper, and tobacco. Major economic losses (9) have led to the status of the pathogen as an A2-listed EPPO quarantine pest (<http://www.eppo.org/QUARANTINE/listA2.htm>) in Europe and the bacterium being considered as a bioterrorism select agent by relevant authorities in the United States (22).

The phylogeny-based classification of the *R. solanacearum* species complex established on the partial endoglucanase (*egl*) gene sequence was reported as a good indicator of relationships between strains (10–12) and it was shown to be congruent with organismal phylogeny based on pangenomic DNA microarray hybridization (16). Brown rot strains are clustered into phylotype IIB sequevar 1 (IIB-1) and phylotype IIB sequevar 2 (IIB-2), historically known as race 3 biovar 2 (R3bv2), and were first described as potato and tomato pathogenic but weakly virulent on other *Solanaceae* spp. (4). This group also presented a high clonal trend, especially for members which were isolated under tem-

perate climate (17,20,36,38), showed different aggressiveness on *Solanaceae* spp. (37), and were able to trigger wilt even at cold temperatures (25).

Among the wide phylogenetic classification of *R. solanacearum*, major trends of pathogenicity were described and little is known about the exact virulence and aggressiveness of these strains. *R. solanacearum* strains which cluster into phylotype I encompassed a majority of lowland (tropical) strains with a wide host range. Within phylotype II, highland and cold-tolerant potato brown rot strains (2) belong to phylotype IIB-1 and IIB-2 (10), while many other lowland strains (formerly R1bv2T) are also able to cause wilt on *Solanaceae* spp., including potato (17). Phylotype IIB encompasses two distinctive clusters of banana Moko disease-causing strains (formerly R2bv1): sequevar 3 (IIB-3) and sequevar 4 (IIB-4). Recently, a new variant of *R. solanacearum*, that is pathogenic to the *Solanaceae* family but not pathogenic to banana (IIB-4NPB), has been recognized and also clusters into phylotype IIB-4 (11,40). Two additional clusters—namely, sequevar 6 and sequevar 24—containing Moko disease-causing strains have been assigned to phylotype IIA. Phylotype IIA contains strains that generally have a broad host range and are primarily isolated from tropical regions (formerly R1bv1). African strains in the relatively newly described phylotype III have been reported to share some pathogenicity traits with brown rot strains, including pathogenicity to potato in the highland of West Cameroon (24). Although phylogenetically indistinguishable, strains clustered into the Indonesian phylotype IV-10 are represented by two distinct species adapted to different hosts: *R. solanacearum* strains pathogenic to both potato and tomato and the blood disease bacterium (BDB) that causes wilt only on banana (11). Closely related to phylotype IV-10, phylotype IV-9 strains are causal agents of the Sumatra disease of cloves, a bacterium transmitted by the tube-building cercopoids *Hindola fulva* in Sumatra and *H. striata* in Java (8).

Corresponding author: P. Prior; E-mail address: philippe.prior@cirad.fr

*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that the online version contains a supplemental table.

doi:10.1094/PHYTO-02-10-0059
© 2010 The American Phytopathological Society

Many plant pathogen genomes are now available and many more are being sequenced, including members of the *R. solanacearum* species complex (https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/about/collabprojects.php?P_id=67). It is generally expected that mining genomic data will lead to major discoveries about the subtle interactions that occur between plants and pathogens, as recently reviewed by Alfano (1). Nevertheless, the *R. solanacearum* species complex encompasses an unusually large number of phenotypically and genetically diverse strains, and it has become obvious that any post-genomic initiative to decipher host specialization should primarily aim at unraveling diversity in phenotypes, with special attention to pathogenicity of strains. Using the phylotyping scheme and related diagnostic tools as a framework, we hypothesized that the genetic and pathogenic diversity of strains originating from Europe and the Mediterranean is much greater than expected. We focused on cold-

tolerant potato brown rot strains of phylotype IIB-1, a major lineage of strains that is phylogenetically closely related to lineages containing banana Moko disease-causing strains. Within phylotype II, which encompasses the widest genetic diversity within the *R. solanacearum* species complex, both the brown rot and Moko disease-causing lineages are reported to be epidemiologically adapted to a particular host. That said, in this post-genomic data-mining era, the purpose of this study was to revisit and identify virulence patterns of these phenotypically divergent but genotypically similar *R. solanacearum* species complex strains.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. A set of 210 *R. solanacearum* strains was obtained and 42 strains were selected (Table 1) to be part of the

TABLE 1. Strains of *Ralstonia solanacearum* used in the phylogenetic study based on sequence variations of partial endoglucanase (*egl*) gene

| Strain ^a | RUN ^b | Origin, host | Phylotype | | GenBank ^e |
|---------------------|------------------|-----------------------------------|------------------|-------------------------|----------------------|
| | | | PCR ^c | <i>egl</i> ^d | |
| GMI8044 | 585 | Grenada, banana | IIA-6 | IIA-6 | GU295013 |
| RUN394 | 394 | Grenada, banana Bluggoe | IIA-6 | IIA-6 | GU295048 |
| CFBP4822 | 646 | Finland, tomato | II | IIA-7 | GU294993 |
| JS927 | 909 | Porto Rico, tomato | II | IIA-7 | GU295027 |
| JS967 | 911 | Kenya, potato | II | IIA-7 | GU295028 |
| CFBP4613 | 896 | Brazil, potato | II | IIA-28 | GU294982 |
| PD1100 | 622 | Egypt, potato | II | IIA-35 | GU295043 |
| CFBP3105 | 685 | Peru, potato | II | IIA-39 | GU294940 |
| CFBP3858 | 689 | Netherlands, potato | II | IIB-1 | AF295259 |
| CFBP3870 | 691 | South Africa, potato | II | IIB-1 | GU294949 |
| CFBP4787 | 633 | Portugal, potato | II | IIB-1 | GU294986 |
| CMR34 | 147 | Cameroon, tomato | II | IIB-1 | EF439750 |
| JT516 | 160 | Reunion, potato | II | IIB-1 | AF295258 |
| LNPV28.23 | 654 | Reunion, potato | II | IIB-1 | GU294927 |
| PSS525 | 256 | Taiwan, potato | II | IIB-1 | EU407303 |
| CFBP1410 | 461 | Colombia, banana plantain | II | IIB-2 | GU294936 |
| CFBP3879 | 628 | Colombia, potato | II | IIB-2 | GU294954 |
| CFBP1416 | 459 | Costa Rica, banana plantain | II | IIB-3 | GU294937 |
| CIP417 | 264 | Philippines, banana | IIB-3 | IIB-3 | GU295004 |
| CIP418 | 265 | Indonesia, peanut | IIB-3 | IIB-3 | GU295005 |
| UW28 | 1366 | Cyprus, potato | IIB-3 | IIB-3 | GU295054 |
| UW9 | 914 | Costa Rica, <i>Heliconia</i> sp. | IIB-3 | IIB-3 | AF295257 |
| CFBP1184 | 908 | Honduras, <i>Musa</i> sp. | IIB-4 | IIB-4 | GU294935 |
| LNPV31.10 | 662 | French Guiana, <i>Musa</i> sp. | IIB-4 | IIB-4 | GU294928 |
| LNPV32.36 | 665 | French Guiana, <i>Musa</i> sp. | IIB-4 | IIB-4 | GU294931 |
| LNPV32.37 | 666 | French Guiana, banana plantain | IIB-4 | IIB-4 | GU294932 |
| LNPV32.40 | 668 | French Guiana, <i>Musa</i> sp. | IIB-4 | IIB-4 | GU294933 |
| UW160 | 588 | Peru, banana plantain | IIB-4 | IIB-4 | GU295051 |
| UW162 | 453 | Peru, banana plantain | IIB-4 | IIB-4 | AF295256 |
| UW170 | 262 | Colombia, <i>Heliconia</i> sp. | IIB-4 | IIB-4 | DQ011550 |
| IBSBF2001 | 981 | Brazil, tomato | II | IIB-25 | GU295017 |
| UQRS607 | 1340 | Iran, potato | II | IIB-25 | GU295050 |
| CFBP6778 | 289 | Martinique, tomato | IIB-4NBP | IIB-4 | EF371851 |
| CFBP6797 | 277 | Martinique, American nightshade | IIB-4NBP | IIB-4 | EF371855 |
| IBSBF1503 | 302 | Brazil, cucumber | IIB-4NBP | IIB-4 | EF371868 |
| JY200 | 280 | Martinique, anthurium | IIB-4NBP | IIB-4 | EF371857 |
| LNPV24.25 | 651 | France, tomato | IIB-4NBP | IIB-4 | GU295039 |
| RUN432 | 432 | French Guiana, water (irrigation) | IIB-4NBP | IIB-4 | GU294926 |
| CMR20 | 137 | Cameroon, tomato | III | III-29 | GU295006 |
| MAFF301552 | 70 | Japan, tomato | IV | IV-8 | GU295042 |
| CFBP6727 | 702 | Indonesia, potato | IV | IV-10 | GU294995 |
| CFBP6728 | 703 | Indonesia, potato | IV | IV-10 | GU294996 |
| Reference strains | | | | | |
| R288 | 90 | China, mulberry | I | I-12 | GQ907153 |
| CFBP7058 | 215 | Cameroon, huckleberry | I | I-13 | EF439740 |
| PSS81 | 258 | Taiwan, tomato | I | I-14 | FJ561066 |
| PSS4 | 157 | Taiwan, tomato | I | I-15 | EU407264 |

(continued on next page)

^a Strains obtained from French and international collections.

^b Identification number of strains in the collection maintained at CIRAD Reunion Island.

^c Phylotypes assignment as determined by multiplex polymerase chain reaction (PCR).

^d Phylotypes and sequevars assignment as determined by variation analysis of the partial *egl* gene sequences.

^e GenBank accession number.

phylogenetic tree from different bacterial collections maintained at Centre de coopération Internationale en Recherche Agromique pour le Développement (Saint Pierre, Reunion Island; Le Lamentin, Martinique, French West Indies), Laboratoire National de la Protection des Végétaux (Angers, France), Institut National de la Recherche Agronomique (Rennes, France), University of Queensland (Brisbane, Australia), and Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (Angers, France). Strains used in this study were isolated from BW field outbreaks or following interception from quarantined material by national plant health inspection services in Europe and the Mediterranean (EuMr). Collected strains were purified (i) onto modified Granada and Sequeira semiselective solid medium (13,27) and (ii) on Kelman's triphenyltetrazolium chloride (TZC-Kelman's) solid medium complemented with 0.5 g of yeast extract (21). Cultures were streaked on plates and incubated for 48 h at 28°C, and a single characteristic *R. solanacearum* colony for each strain was

harvested and stored at -80°C on beads (Pro-Lab Diagnostics, Microbank, Toronto).

Multiplex polymerase chain reactions for strains identification. The multiplex polymerase chain reaction (Pmx-PCR), developed by Fegan and Prior (10), was used to confirm that strains were *R. solanacearum* and to identify the phylotype to which they belonged. Strains from phylotype II originating from EuMr were further characterized by using a second specific multiplex PCR for Moko disease-causing strains (Mmx-PCR) in the *Musa* phylotypes IIA sequevar 6 (IIA-6), IIB-3, IIB-4, or IIB-4NPB (29,40).

Sequencing of partial *egl* gene and phylogeny. Sequences of *egl* ($n = 186$) (Table 1) were either retrieved from GenBank ($n = 57$) or determined in this study ($n = 129$) from a selection of strains isolated or intercepted in EuMr with a special care to strains isolated from potato. PCR amplicons of 750 bp were amplified following previously published methods (10,12,24) and

TABLE 1. (continued from preceding page)

| Strain ^a | RUN ^b | Origin, host | Phylotype | | GenBank ^c |
|---------------------|------------------|----------------------------------|------------------|-------------------------|----------------------|
| | | | PCR ^c | <i>egl</i> ^d | |
| ACH92 | 44 | Australia, Ginger | I | I-16 | AF295254 |
| P11 | 337 | China, peanut | I | I-17 | FJ561068 |
| GMI1000 | 54 | French Guiana, tomato | I | I-18 | AF295251 |
| JT519 | 471 | Reunion, <i>Pelargonium</i> sp. | I | I-31 | GU295032 |
| PSS219 | 257 | Taiwan, tomato | I | I-34 | FJ561167 |
| O3 | 339 | China, Olive tree | I | I-44 | FJ561069 |
| CIP365 | 47 | Philippines, potato | I | I-45 | GQ907151 |
| MAD17 | 320 | Madagascar, Pepper | I | I-46 | GU295040 |
| GMI8254 | 597 | Indonesia, tomato | I | I-47 | GU295014 |
| M2 | 343 | China, mulberry | I | I-48 | FJ561067 |
| UW181 | 454 | Venezuela, banana plantain | IIA-6 | IIA-6 | GU295053 |
| ICMP7963 | 55 | Kenya, potato | II | IIA-7 | AF295263 |
| K60 | 65 | USA, tomato | II | IIA-7 | AF295262 |
| IBSBF1900 | 301 | Brazil, <i>Musa</i> sp. | II | IIA-24 | EF371839 |
| CIP301 | 45 | Peru, potato | II | IIA-35 | GU295003 |
| IBSBF1546 | 298 | Brazil, California fuchsia | II | IIA-35 | EF371877 |
| CFBP2957 | 27 | Martinique, tomato | II | IIA-36 | AF295265 |
| CFBP6779 | 288 | Martinique, <i>Canna indica</i> | II | IIA-38 | EF371872 |
| CFBP2958 | 28 | Guadeloupe, tomato | II | IIA-39 | AF295266 |
| CFBP2968 | 58 | Reunion, potato | II | IIA-39 | EF371806 |
| UW469 | 109 | Brazil, potato | II | IIA-40 | DQ657612 |
| CFBP7032 | 150 | Cameroon, tomato | II | IIA-41 | EF439726 |
| T1-UY | 448 | Uruguay, tomato | II | IIA-50 | GU295049 |
| CFBP7054 | 203 | Cameroon, tomato | II | IIA-52 | EF439725 |
| IPO1609 | 1 | Netherlands, potato | II | IIB-1 | EF371814 |
| UW551 | 449 | Kenya, <i>Pelargonium</i> sp. | II | IIB-1 | DQ657596 |
| CFBP4611 | 894 | Colombia, potato | II | IIB-2 | GU294981 |
| Mok2 | 74 | Philippines, <i>Musa</i> sp. | IIB-3 | IIB-3 | EF371841 |
| CFBP6783 | 17 | Martinique, <i>Heliconia</i> sp. | IIB-4NPB | IIB-4 | EF371852 |
| UW163 | 586 | Peru, banana plantain | IIB-4 | IIB-4 | GU295052 |
| CIP10 | 40 | Peru, potato | II | IIB-25 | AF295260 |
| CIP240 | 482 | Brazil, potato | II | IIB-26 | EF647739 |
| IBSBF1712 | 299 | Brazil, <i>Pelargonium</i> sp. | II | IIB-27 | EF371833 |
| NCPPB3987 | 79 | Brazil, potato | II | IIB-28 | AF295261 |
| CFBP7014 | 297 | Trinidad, anthurium | II | IIB-51 | AF371831 |
| JT525 | 60 | Reunion, <i>Pelargonium</i> sp. | III | III-19 | AF295272 |
| MAD-29 | 332 | Madagascar, potato | III | III-19 | GU295041 |
| CMR33 | 146 | Cameroon, tomato | III | III-20 | GU295007 |
| J25 | 56 | Kenya, potato | III | III-20 | AF295279 |
| NCPPB1018 | 479 | Angola, potato | III | III-21 | AF295271 |
| NCPPB332 | 1298 | Zimbabwe, potato | III | III-22 | AF295276 |
| CFBP3059 | 39 | Burkina Faso, eggplant | III | III-23 | AF295270 |
| CMR15 | 133 | Cameroon, tomato | III | III-29 | EF439743 |
| CMR32 | 145 | Cameroon, huckleberry | III | III-29 | EF439749 |
| DGBBC1227 | 364 | Guinea, potato | III | III-42 | GU295011 |
| DGBBC1125 | 369 | Guinea, potato | III | III-43 | GU295008 |
| DGBBC1138 | 362 | Guinea, potato | III | III-43 | GU295009 |
| CMR66 | 166 | Cameroon, huckleberry | III | III-49 | EF439729 |
| MAFF301558 | 71 | Japan, potato | IV | IV-8 | DQ011558 |
| R28 | 89 | Indonesia, clove | IV | IV-9 | DQ011552 |
| PSI7 | 83 | Indonesia, tomato | IV | IV-10 | EF371804 |
| R229 | 62 | Indonesia, banana | IV | IV-10 | GU295045 |
| ACH732 | 14 | Australia, tomato | IV | IV-11 | GQ907150 |

sequenced by MACROGEN Korea (single-pass double-stranded analysis) using the Endo-F and the Endo-R primers. Sequences were manually edited, checked, and trimmed at the consensus start sequence 5'-ACGGCGAT-3' or 5'-ACGGCGGC-3' and the consensus end sequence 5'-CAGTGG-3'. Alignment was conducted under the ARB Package (23) on a Linux system and phylogenetic trees generated using the neighbor-joining (NJ) algorithm corrected using the Jukes-Cantor model. Tree topology was tested using bootstrap analysis of 2,000 resamplings of the data.

Pathogenicity testing. A subset of *R. solanacearum* strains ($n = 167$) for which *egl* gene sequences had previously been determined was tested for pathogenicity on different host plants. Cells were grown from a single -80°C freeze-stored bead by placing the bead in 4.5 ml of Luria-Bertani broth for 24 h at 28°C with 250 rpm agitation for aeration; A 50- μl volume was streaked on TZC-Kelman's medium plate. An isolated colony was selected to be restreaked and cultured for 24 to 36 h at 28°C on the same medium. A bacterial suspension in 10 mM Tris, pH 7.1 (7 to 9; Sigma-Aldrich, St. Louis) was made from the restreaked culture and adjusted to 10^8 CFU/ml as determined by measuring the optical density at 0.1 at 650 nm. Plants were inoculated at the three-leaf development stage by pouring 5 ml of suspension on lateral roots that had been severed along one side using a scalpel. Negative control plants consisted of pouring 10 mM Tris (pH 7.1) onto severed roots. Pathogenicity was assessed on 10 plants per strain–host–experimental combination for tomato and eggplant accessions, whereas pathogenicity to banana was tested on 5 plants/strain. Infected plants were placed in environmental growth chambers called Rotoplan (Strader, Pellouailles les Vignes, France). Rotoplans were agreed for different norms of security levels (NS) containment: nonexotic strains were incubated in growth chambers termed NS2 and quarantine exotic organisms in chambers termed NS3. Strains ($n = 87$) with a phylogenetic position previously recognized to be present on Reunion were considered to be without environmental risk and, therefore, were incubated under the standard security level NS2-Rotoplan. Strains exotic to Reunion ($n = 80$) were incubated in a high security quarantine level NS3-Rotoplan. Each strain–plant combination was separated from the other combinations using a watertight plastic bag to avoid cross-contaminations. Development of disease was visually assessed at 3-day intervals for wilting during 30 days. At the end of the assay, surviving asymptomatic plants were sampled by cutting a 2-cm stem segment at collar level, and analyzed for latent infection by *R. solanacearum* by isolating the strain on a TZC-Kelman's medium plate. Special care was given to the sampling of infected banana for reculturing *R. solanacearum* targeting the corm leaf (CL) junction. A 2-cm segment of the CL section was sampled from all asymptomatic banana plants 3 weeks postinoculation; the first circular leaf was removed to avoid external contamination. Samples were crushed in 5 ml of 10 mM Tris, pH 7.1, and left for 1 h. A 50- μl aliquot of each extract was plated onto Sequeira's and TZC-Kelman's medium and incubated at 28°C for 72 h. A strain was said to be virulent to a particular plant species when showing the capacity to produce wilt symptoms and death on at least one single plant. Thus, pathogenicity of a strain was described by using two criteria: infections that resulted in plant death (wilt) and those that turned latent in a healthy plant carrier.

Pathogenicity assay of *R. solanacearum*. Tests were performed on potato cv. Bintje (Munterschen \times Franschen) provided by the Fédération Nationale des Producteurs de Plantes de Pommes de Terre (Rennes, France). Experimental conditions were two different regimes of night and day temperature conditions in the NS2-Rotoplan: temperate cold (15 to 24°C) and tropical hot (24 to 30°C). Experiments in the NS3-Rotoplan were conducted in tropical hot temperature conditions. Strains ($n = 156$) were inoculated to potato plants to assess their phenotype (Tables 2 and 3).

Pathogenicity assay of brown rot ecotype strains. Comparative analysis of virulence and aggressiveness was based on strains ($n = 14$) (Table 4) described above as potato pathogenic: cold-tolerant brown rot strains phylotype IIB-1, African brown rot strains phylotype III (24), and reference strains from phylotype I. Test were performed on tomato (*Solanum lycopersicon*) and on eggplant (*S. melongena*) carrying different levels of resistance to BW: tomato L390 is highly susceptible to *R. solanacearum* (33) and, thus, strains that wilt this tomato were considered virulent on *Solanaceae* spp.; eggplant MM960 is moderately resistant to BW (3) and tomato Hawaii7996 is highly resistant (5,33,35,39). These plants were grown in temperate cold and tropical hot temperature conditions in NS2-Rotoplan.

Pathogenicity assay of phylotype IIB. The phenotype of strains ($n = 29$) (Table 5) clustered into brown rot IIB-1 and IIB-2; Moko disease IIA-6, IIB-3, and IIB-4; and blood disease bacterium IV-10 lineages were used to challenge on L390, MM960, Hawaii7996 ($n = 10$ plants), and Cavendish banana cv. Grande Naine ($n = 5$ plants) to established virulence pattern. Infected plants were placed in tropical hot temperature conditions in NS3-Rotoplan.

Statistics. Pathogenicity was estimated by using a colonization index (CI) (28) based on wilted plants and latent infections: $CI = N_{WP} + (N_S \times R_S)$, where N_{WP} is the percentage of wilted plants, N_S is the percentage of symptomless plants, and R_S is the percentage of those asymptomatic plants sampled from which *R. solanacearum* was recovered. Data from pathogenicity tests were analyzed with R software 2.9.2 (31) and its specific libraries *cluster*, *MASS*, and *fpc*. The purpose of the following clustering method was to characterize the variability of phenotypes and, thus, identify clusters of strains that shared similar virulence or aggressiveness patterns. We used two methods to discriminate these clusters: (i) an agglomerative nesting which produced an ascendant hierarchical classification tree using Manhattan distance, where the validation of clusters is based on the internode distances, and (ii) a fuzzy analysis clustering which produced a partitioning, where the validation of the number of clusters was assessed by calculating the corrected Rand index between two clusterings with k and $k + 1$ clusters. A Rand index close to one validates the smallest clustering. Classification and partitioning were checked with biological data for supporting meaningful clusters.

RESULTS

Genetic diversity and phylogeny. Based on the PCR approach, strains of *R. solanacearum* used in this study ($n = 210$) (Table 1) clustered into phylotype I ($n = 2$; 1%), phylotype II ($n = 197$; 93.8%), phylotype III ($n = 8$; 3.8%), and phylotype IV ($n = 3$; 1.4%). From this collection, 106 strains (50.5%) originated or were intercepted in EuMr. Among the 15 different hosts of origin, potato and tomato were predominant, with 51% ($n = 107$) and 22% ($n = 46$) of the strains, respectively. The initial NJ tree computed from *egl* sequences was composed of the subset of 129 newly obtained sequences associated with 57 reference sequences representing all phylotypes; however, because all brown-rot strains in phylotype IIB-1 produced identical partial *egl* sequences, only 7 representatives were included to compute the phylogenetic tree (Fig. 1). Strains isolated from potato ($n = 84$) were distributed among all four phylotypes. A majority of strains from EuMr ($n = 71$) were isolated from potato ($n = 57$). The *egl* sequences of 94 of 129 strains clustered into phylotype IIB-1, including 66 sequences from strains originating from EuMr and 75 sequences from strains isolated from potato. Only five strains originating from EuMr were not phylotype IIB-1: these strains clustered into phylotype IIA-7 with the tomato strain CFBP4822 from Finland, phylotype IIA-35 with the potato strain PD1100 from Egypt, phylotype IIB-3 with the potato strain UW28 from

Cyprus (7), phylotype IIB-4NPB with the tomato strain LNPV24.25 from France, and phylotype IIB-25 with the potato strain UQRS607 from Iran.

Pathogenicity assay of *R. solanacearum*. Strains of *R. solanacearum* inoculated to potato distributed into two clusters validated by the Rand index when considering separate temperature conditions. However, when considering pathogenicity scoring at both temperature conditions, the Rand index validated the distribution of strains into three clusters (Table 2). Cluster A strains ($n = 28$) were highly aggressive regardless of the incubation temperature and were all assigned into phylotype IIB-1 that belongs to cluster A (68% isolated from potato and 54% originating from EuMr). Cluster B strains ($n = 24$) were highly aggressive under tropical hot conditions but weakly aggressive (developing few or no wilted plants) under temperate cold temperatures. Strains in this group belonged to phylotypes I, IIA, IIB-1, III, and IV (58% isolated from potato and 27% originating from EuMr). Cluster C strains ($n = 35$) induced little or no wilt symptoms regardless of the incubation temperature. In total, 71%

of strains from Cluster C were isolated from potato (57% originating from EuMr), of which 69% were phylotype IIB-1 and other were representatives of phylotypes I, IIA, III, and IV. In this experiment, certain strains did not produce BW under either tropical hot or temperate cold conditions, although these strains were able to establish latent infections in potato ($n = 6$). These strains were representative of phylotypes IIB-1 ($n = 5$) and IIB-26 (CIP240).

Strains not pathogenic to potato ($n = 20$; $CI = 0$) clustered into all phylotypes; namely, I-45, IIA-7, IIB-1 ($n = 15$), III-19, III-20, and IV-9. Strains not detected at Reunion (exotic) that were tested in NS3-Rotoplan ($n = 69$) under tropical hot temperature conditions distributed into three clusters validated by the Rand index (Table 3). Cluster A strains ($n = 32$; $CI \geq 90$) were highly aggressive and distributed in phylotypes IIB-1, IIB-2, IIB-4, III (CMR20), and IV. Most of these strains were isolated from potato (50%) and originated from EuMr (37.5%). Cluster B strains were moderately aggressive ($n = 20$; $80 \geq CI \geq 50$) and distributed in phylotypes IIA, IIB, III, and IV. Among these strains, 45% were

TABLE 2. Pathogenicity to potato of *Ralstonia solanacearum* strains clustered into phylotypes reported at Reunion (nonexotic strains), grown under different temperatures in security level NS2-Rotoplan^a

| Strain | Origin, host | Phylotype | Hot ^b | | | Cold ^c | | | Global ^d |
|----------|------------------------|-----------|------------------|-----|---------|-------------------|-----|---------|---------------------|
| | | | w | CI | Cluster | w | CI | Cluster | |
| PSS4 | Taiwan, tomato | I-15 | 9 | 90 | A | 3 | 30 | C | B |
| GMI1000 | French Guiana, tomato | I-18 | 8 | 80 | A | 0 | 30 | C | B |
| CIP365 | Philippines, potato | I-45 | 0 | 0 | C | 0 | 0 | C | C |
| JS927 | Porto Rico, tomato | IIA-7 | 0 | 0 | C | 0 | 0 | C | C |
| JS967 | Kenya, potato | IIA-7 | 2 | 20 | C | 0 | 0 | C | C |
| CFBP4613 | Brazil, potato | IIA-28 | 4 | 40 | C | 0 | 0 | C | B |
| CFBP3105 | Peru, potato | IIA-39 | 4 | 40 | C | 0 | 0 | C | B |
| UW469 | Brazil, potato | IIA-40 | 5 | 50 | A | 0 | 0 | C | B |
| CFBP1417 | Australia, potato | IIB-1 | 4 | 90 | A | 4 | 70 | A | A |
| CFBP1810 | Haiti, potato | IIB-1 | 8 | 80 | A | 6 | 90 | A | A |
| CFBP3579 | France, tomato | IIB-1 | 0 | 0 | C | 0 | 0 | C | C |
| CFBP3583 | Egypt, potato | IIB-1 | 0 | 10 | C | 0 | 0 | C | C |
| CFBP3784 | Portugal, potato | IIB-1 | 1 | 20 | C | 1 | 30 | C | B |
| CFBP3785 | Portugal, potato | IIB-1 | 8 | 80 | A | 3 | 30 | C | B |
| CFBP3857 | Netherlands, potato | IIB-1 | 2 | 20 | C | 0 | 0 | C | C |
| CFBP3858 | Netherlands, potato | IIB-1 | 7 | 70 | A | 2 | 60 | A | B |
| CFBP3863 | Morocco, potato | IIB-1 | 10 | 100 | A | 6 | 90 | A | A |
| CFBP3865 | France, potato | IIB-1 | 0 | 0 | C | 0 | 0 | C | C |
| CFBP3870 | South Africa, potato | IIB-1 | 3 | 50 | A | 2 | 30 | C | B |
| CFBP3884 | Sweden, potato | IIB-1 | 0 | 0 | C | 0 | 0 | C | C |
| CFBP3886 | Belgium, potato | IIB-1 | 4 | 40 | C | 1 | 10 | C | B |
| CFBP3927 | Greece, potato | IIB-1 | 0 | 0 | C | 0 | 0 | C | C |
| CFBP3937 | France, bittersweet | IIB-1 | 10 | 100 | A | 9 | 90 | A | A |
| CFBP4577 | Egypt, potato | IIB-1 | 0 | 0 | C | 0 | 0 | C | C |
| CFBP4578 | Egypt, tomato | IIB-1 | 5 | 60 | A | 2 | 30 | C | B |
| CFBP4583 | Egypt, potato | IIB-1 | 10 | 100 | A | 10 | 100 | A | A |
| CFBP4585 | Turkey, potato | IIB-1 | 10 | 100 | A | 9 | 100 | A | A |
| CFBP4587 | United Kingdom, potato | IIB-1 | 10 | 100 | A | 10 | 100 | A | A |
| CFBP4588 | United Kingdom, potato | IIB-1 | 4 | 60 | A | 3 | 70 | A | B |
| CFBP4597 | United Kingdom, tomato | IIB-1 | 10 | 100 | A | 10 | 100 | A | A |
| CFBP4598 | Cyprus, potato | IIB-1 | 1 | 10 | C | 0 | 0 | C | C |
| CFBP4599 | Sweden, potato | IIB-1 | 8 | 80 | A | 8 | 80 | A | A |
| CFBP4600 | Sweden, bittersweet | IIB-1 | 10 | 100 | A | 8 | 100 | A | A |
| CFBP4604 | Netherlands, potato | IIB-1 | 10 | 100 | A | 9 | 100 | A | A |
| CFBP4609 | Slovenia, potato | IIB-1 | 0 | 0 | C | 0 | 0 | C | C |
| CFBP4634 | Spain, potato | IIB-1 | 2 | 20 | C | 2 | 20 | C | C |
| CFBP4652 | France, tomato | IIB-1 | 7 | 70 | A | 3 | 50 | A | B |
| CFBP4787 | Portugal, potato | IIB-1 | 7 | 70 | A | 8 | 100 | A | A |

(continued on next page)

^a Abbreviations: w = number of wilted plants out of 10 plants; colonization index (CI) = $N_{WP} + (N_S \times R_S)$, where N_{WP} = percentage of wilted plants, N_S = percentage of symptomless plants, and R_S = percentage of those asymptomatic plants sampled from which *R. solanacearum* was recovered; and Cluster = clusters based on CI computed after fuzzy analysis clustering. Rand index validated, in cold temperatures conditions, two clusters: A (CI ≥ 50) and B (CI ≤ 40) (2 vs. 3 = 0.634; 2 vs. 4 = 0.878; 3 vs. 4 = 0.878). Rand index validated, in hot tropical temperatures conditions, two clusters: A (CI ≥ 50) and B (CI ≤ 40) (2 vs. 3 = 0.594; 2 vs. 4 = 0.499; 3 vs. 4 = 0.557).

^b Hot conditions referred to a night and day temperatures of 24 and 30°C, respectively.

^c Cold conditions referred to a night and day temperatures of 15 and 24°C, respectively.

^d Global = clusters based on CI on both hot and cold temperatures computed after fuzzy analysis clustering. Rand index validated three clusters: A, B, and C. A Rand index close to 1 validates the smallest clustering (2 vs. 3 = 0.491; 2 vs. 4 = 0.491; 3 vs. 4 = 0.770).

members of phylotype IIB-1, 75% were isolated from potato, and 30% originated from EuMr. Cluster C strains ($n = 17$; $CI \leq 40$) were weakly or not aggressive. This cluster encompassed a majority of phylotype IIB-1 (47%) and strains in phylotype IIA and III. Most of these were strains isolated from potato (82%) and originated from EuMr (76%). Some strains in phylotypes IIA-7 (CFBP4822), IIB-1 ($n = 5$), IIB-3 (Molk2 and UW28), and III-21 were not able to develop wilt on potato under tropical hot experimental conditions but were able to establish latent infections. Strains not pathogenic to potato ($CI = 0$) in tropical hot experimental conditions were composed of phylotype IIB-1 (potato strains CFBP3873 from Belgium and CFBP4607 from Portugal) and Moko disease-causing IIB-4 strain CFBP1184 from Honduras.

Pathogenicity assay of brown rot ecotype strains. In the NS2-Rotoplan, a subset of strains ($n = 14$) tested under tropical hot and temperate cold temperatures pathogenic to potato distributed into two clusters validated by the Rand index (Table 4). An identical clustering result was obtained whether temperatures were statistically analyzed separately or not. Strains in cluster A

were all IIB-1 strains with high pathogenicity whatever the plant-temperature combinations, except the South African potato strain CFBP3870 assigned in cluster B. Strains in cluster B were weakly pathogenic under temperate cold temperature conditions compared with the tropical hot temperature conditions.

Pathogenicity assay of phylotype IIB. Under tropical hot temperature conditions, strains tested in NS3-Rotoplan ($n = 29$) distributed in three different clusters that were validated by the Rand index (Table 5). Cluster A strains ($n = 5$) were highly virulent and phylogenetically clustered into phylotypes IIB-1 and IIB-4NPB. Cluster B strains ($n = 16$) were able to wilt or to establish latent infections on all tested hosts; namely, GMI1000 (phylotype I-18) and Moko disease-causing strains from phylotypes IIA-6, IIB-3, and IIB-4. Cluster C strains ($n = 8$) caused no or little wilt or strains that were able to establish latent infections on susceptible tomato L390. Cluster C included strains from phylotypes IIA-6, IIB-2, IIB-3, and IIB-4 but also from phylotypes IIB-25 and IV-10. Two strains, CFBP1410 and CFBP1416, in phylotypes IIB-2 and IIB-3, respectively, were not able to develop wilt in tropical hot temperature conditions but did establish latent

TABLE 2. (continued from preceding page)

| Strain | Origin, host | Phylotype | Hot ^b | | | Cold ^c | | | Global ^d |
|------------|---------------------------------|-----------|------------------|-----|---------|-------------------|-----|---------|---------------------|
| | | | w | CI | Cluster | w | CI | Cluster | |
| CFBP4788 | France, tomato | IIB-1 | 0 | 0 | C | 0 | 0 | C | C |
| CFBP4801 | Reunion, tomato | IIB-1 | 9 | 90 | A | 8 | 80 | A | A |
| CFBP4808 | Israel, potato | IIB-1 | 0 | 0 | C | 0 | 0 | C | C |
| CFBP4811 | France, Black nightshade | IIB-1 | 0 | 0 | C | 0 | 0 | C | C |
| CFBP4812 | France, tomato | IIB-1 | 0 | 0 | C | 0 | 0 | C | C |
| CFBP4821 | Sweden, potato | IIB-1 | 0 | 0 | C | 0 | 0 | C | C |
| CFBP7101 | Spain, potato | IIB-1 | 0 | 0 | C | 0 | 20 | C | C |
| CFBP7105 | Spain, water (river) | IIB-1 | 0 | 10 | C | 0 | 0 | C | C |
| CFBP7108 | Kenya, <i>Pelargonium</i> sp. | IIB-1 | 4 | 60 | A | 0 | 70 | A | B |
| CMR34 | Cameroon, tomato | IIB-1 | 8 | 90 | A | 9 | 100 | A | A |
| CMR44 | Cameroon, potato | IIB-1 | 10 | 100 | A | 10 | 100 | A | A |
| GRISP2335D | France, potato | IIB-1 | 10 | 100 | A | 9 | 100 | A | A |
| GRISP2336B | France, tomato | IIB-1 | 9 | 90 | A | 9 | 100 | A | A |
| IPO1609 | Netherlands, potato | IIB-1 | 1 | 10 | C | 0 | 0 | C | C |
| JQ1006 | Reunion, potato | IIB-1 | 9 | 100 | A | 0 | 0 | C | B |
| JQ1019 | Reunion, potato | IIB-1 | 5 | 60 | A | 4 | 50 | A | B |
| JQ1023 | Reunion, tomato | IIB-1 | 3 | 40 | C | 1 | 30 | C | B |
| JQ1051 | Reunion, tomato | IIB-1 | 0 | 0 | C | 0 | 0 | C | C |
| JQ1073 | Reunion, tomato | IIB-1 | 10 | 100 | A | 9 | 100 | A | A |
| JQ1107 | Reunion, potato | IIB-1 | 10 | 100 | A | 10 | 100 | A | A |
| JQ1131 | Reunion, potato | IIB-1 | 8 | 90 | A | 7 | 80 | A | A |
| JS925 | Sri Lanka, potato | IIB-1 | 6 | 60 | A | 10 | 100 | A | A |
| JS926 | India, potato | IIB-1 | 0 | 20 | C | 0 | 0 | C | C |
| JT511 | Reunion, potato | IIB-1 | 8 | 80 | A | 4 | 60 | A | B |
| JT516 | Reunion, potato | IIB-1 | 1 | 30 | C | 0 | 40 | C | B |
| JT646 | Sri Lanka, potato | IIB-1 | 0 | 0 | C | 0 | 0 | C | C |
| LMG17139 | Cyprus, potato | IIB-1 | 10 | 100 | A | 8 | 100 | A | A |
| LNPV19.66 | France, potato | IIB-1 | 10 | 100 | A | 7 | 80 | A | A |
| LNPV23.54 | France, potato | IIB-1 | 0 | 0 | C | 0 | 0 | C | C |
| LNPV27.43 | Guadeloupe, anthurium | IIB-1 | 0 | 0 | C | 0 | 0 | C | C |
| LNPV28.23 | Reunion, potato | IIB-1 | 10 | 100 | A | 10 | 100 | A | A |
| LNPV28.49 | France, bittersweet | IIB-1 | 10 | 100 | A | 8 | 90 | A | A |
| PD441 | Sweden, potato | IIB-1 | 0 | 10 | C | 0 | 10 | C | C |
| PSS525 | Taiwan, potato | IIB-1 | 8 | 100 | A | 10 | 100 | A | A |
| RTG2 | Guinea, potato | IIB-1 | 9 | 100 | A | 6 | 100 | A | A |
| UW551 | Kenya, <i>Pelargonium</i> sp. | IIB-1 | 10 | 100 | A | 7 | 90 | A | A |
| CIP240 | Brazil, potato | IIB-26 | 0 | 20 | C | 0 | 0 | C | C |
| JT525 | Reunion, <i>Pelargonium</i> sp. | III-19 | 0 | 0 | C | 0 | 0 | C | C |
| MAD-29 | Madagascar, potato | III-19 | 2 | 20 | C | 0 | 0 | C | C |
| CMR33 | Cameroon, tomato | III-20 | 3 | 30 | C | 0 | 20 | C | B |
| J25 | Kenya, potato | III-20 | 0 | 0 | C | 0 | 0 | C | C |
| CFBP3059 | Burkina Faso, eggplant | III-23 | 7 | 80 | A | 0 | 0 | C | B |
| CMR32 | Cameroon, huckleberry | III-29 | 3 | 40 | C | 1 | 20 | C | B |
| DGBBC1227 | Guinea, potato | III-42 | 10 | 100 | A | 0 | 10 | C | B |
| DGBBC1125 | Guinea, potato | III-43 | 1 | 20 | C | 0 | 0 | C | C |
| DGBBC1138 | Guinea, potato | III-43 | 7 | 70 | A | 0 | 20 | C | B |
| CMR66 | Cameroon, huckleberry | III-49 | 6 | 60 | A | 0 | 0 | C | B |
| MAFF301552 | Japan, tomato | IV-8 | 4 | 50 | A | 0 | 10 | C | B |
| R28 | Indonesia, clove | IV-9 | 0 | 0 | C | 0 | 0 | C | C |

TABLE 3. Pathogenicity to potato of *Ralstonia solanacearum* strains clustered into phylotypes not reported at Reunion (exotic strains), grown under tropical hot 24 and 30°C (night and day, respectively) temperatures in security level NS3-Rotoplan

| Strain | Origin, host | Phylotype | w ^a | CI ^b | Cluster ^c |
|------------|-----------------------------------|-----------|----------------|-----------------|----------------------|
| RUN394 | Grenada, banana Bluggoe | IIA-6 | 4 | 60 | B |
| CFBP4822 | Finland, tomato | IIA-7 | 0 | 10 | C |
| ICMP7963 | Kenya, potato | IIA-7 | 5 | 70 | B |
| CIP301 | Peru, potato | IIA-35 | 2 | 40 | C |
| IBSBF1546 | Brazil, California fuchsia | IIA-35 | 9 | 100 | A |
| PD1100 | Egypt, potato | IIA-35 | 3 | 40 | C |
| CFBP2968 | Reunion, potato | IIA-39 | 7 | 80 | B |
| AP31H | Uruguay, potato | IIB-1 | 5 | 70 | B |
| CFBP3582 | Egypt, potato | IIB-1 | 0 | 50 | B |
| CFBP3872 | Belgium, potato | IIB-1 | 7 | 80 | B |
| CFBP3873 | Belgium, potato | IIB-1 | 0 | 0 | C |
| CFBP3874 | Belgium, potato | IIB-1 | 10 | 100 | A |
| CFBP3876 | Belgium, potato | IIB-1 | 1 | 20 | C |
| CFBP3885 | Belgium, potato | IIB-1 | 0 | 20 | C |
| CFBP3889 | Spain, potato | IIB-1 | 0 | 40 | C |
| CFBP4580 | Egypt, potato | IIB-1 | 9 | 100 | A |
| CFBP4581 | Egypt, potato | IIB-1 | 9 | 100 | A |
| CFBP4582 | Egypt, potato | IIB-1 | 9 | 100 | A |
| CFBP4584 | Egypt, potato | IIB-1 | 10 | 100 | A |
| CFBP4601 | Belgium, potato | IIB-1 | 1 | 10 | C |
| CFBP4605 | Netherlands, potato | IIB-1 | 9 | 90 | A |
| CFBP4607 | Portugal, potato | IIB-1 | 0 | 0 | C |
| CFBP4608 | Portugal, potato | IIB-1 | 0 | 30 | C |
| CFBP4635 | Spain, potato | IIB-1 | 9 | 100 | A |
| CFBP4823 | Egypt, potato | IIB-1 | 4 | 60 | B |
| CFBP7102 | Spain, potato | IIB-1 | 5 | 70 | B |
| CFBP7103 | Spain, potato | IIB-1 | 10 | 100 | A |
| CFBP7104 | Spain, potato | IIB-1 | 8 | 80 | B |
| DGBBC1181 | Belgium, potato | IIB-1 | 4 | 50 | B |
| ETAC | Uruguay, potato | IIB-1 | 3 | 50 | B |
| JS976 | Spain, potato | IIB-1 | 10 | 100 | A |
| JS977 | Spain, potato | IIB-1 | 10 | 100 | A |
| LMG2300 | Israel, potato | IIB-1 | 0 | 40 | C |
| LMG9576 | Belgium, potato | IIB-1 | 8 | 90 | A |
| PO41 | China, potato | IIB-1 | 4 | 90 | A |
| RM | Uruguay, potato | IIB-1 | 10 | 100 | A |
| UW394 | South Africa, potato | IIB-1 | 5 | 70 | B |
| CFBP1410 | Colombia, banana plantain | IIB-2 | 9 | 100 | A |
| CFBP3879 | Colombia, potato | IIB-2 | 4 | 70 | B |
| CFBP4611 | Colombia, potato | IIB-2 | 3 | 80 | B |
| CIP418 | Indonesia, peanut | IIB-3 | 5 | 70 | B |
| Molk2 | Philippines, <i>Musa</i> sp. | IIB-3 | 0 | 40 | C |
| UW28 | Cyprus, potato | IIB-3 | 0 | 40 | C |
| CFBP1184 | Honduras, <i>Musa</i> sp. | IIB-4 | 0 | 0 | C |
| LNPV31.10 | French Guiana, <i>Musa</i> sp. | IIB-4 | 9 | 100 | A |
| LNPV32.36 | French Guiana, <i>Musa</i> sp. | IIB-4 | 7 | 90 | A |
| LNPV32.37 | French Guiana, banana plantain | IIB-4 | 9 | 90 | A |
| LNPV32.40 | French Guiana, <i>Musa</i> sp. | IIB-4 | 9 | 90 | A |
| UW162 | Peru, banana plantain | IIB-4 | 5 | 50 | B |
| UW163 | Peru, banana plantain | IIB-4 | 7 | 90 | A |
| UW170 | Colombia, <i>Heliconia</i> sp. | IIB-4 | 3 | 50 | B |
| CIP10 | Peru, potato | IIB-25 | 5 | 70 | B |
| UQRS607 | Iran, potato | IIB-25 | 2 | 20 | C |
| NCPPB3987 | Brazil, potato | IIB-28 | 3 | 100 | A |
| CFBP7014 | Trinidad, anthurium | IIB-51 | 9 | 100 | A |
| CFBP6778 | Martinique, tomato | IIB-4NPB | 10 | 100 | A |
| CFBP6783 | Martinique, <i>Heliconia</i> sp. | IIB-4NPB | 9 | 90 | A |
| CFBP6797 | Martinique, American nightshade | IIB-4NPB | 10 | 100 | A |
| JY200 | Martinique, anthurium | IIB-4NPB | 10 | 100 | A |
| LNPV24.25 | France, tomato | IIB-4NPB | 9 | 100 | A |
| RUN432 | French Guiana, water (irrigation) | IIB-4NPB | 10 | 100 | A |
| NCPPB1018 | Angola, potato | III-21 | 0 | 20 | C |
| NCPPB332 | Zimbabwe, potato | III-22 | 1 | 10 | C |
| CMR15 | Cameroon, tomato | III-29 | 2 | 50 | B |
| CMR20 | Cameroon, tomato | III-29 | 3 | 100 | A |
| MAFF301558 | Japan, potato | IV-8 | 8 | 90 | A |
| CFBP6727 | Indonesia, potato | IV-10 | 8 | 100 | A |
| CFBP6728 | Indonesia, potato | IV-10 | 6 | 80 | B |
| PSI7 | Indonesia, tomato | IV-10 | 10 | 100 | A |

^a Number of wilted plants out of 10 plants.^b Colonization index (CI) = $N_{WP} + (N_S \times R_S)$, where N_{WP} = percentage of wilted plants, N_S = percentage of symptomless plants, and R_S = percentage of those asymptomatic plants sampled from which *R. solanacearum* was recovered.^c Cluster = clustering based on the CI and obtained by a fuzzy analysis clustering. Rand index validated three clusters: A ($CI \geq 90$), B ($80 \geq CI \geq 50$), and C ($CI \leq 40$). A Rand index close to 1 validates the smallest clustering (2 vs. 3 = 0.484; 2 vs. 4 = 0.514; 3 vs. 4 = 0.811).

infections in plants. Nonpathogenic strains to both tomato and eggplant ($n = 4$) in tropical hot experimental conditions were phylogenetically clustered into phylotypes IIA-6, IIB-3, and IV-10. Strains pathogenic to banana were members of Moko phylotypes IIA-6, IIB-3, and IIB-4 and BDB phylotype IV-10 lineages. Strain CIP418 (phylotype IIB-3) isolated from peanut in Indonesia was virulent to banana and strain UW28 (phylotype IIB-3) isolated from potato in Indonesia Cyprus was not pathogenic on both host plants. All strains in Moko lineages established infection in banana plants (Table 5). Strains in phylotype IIB-4NPB were not able to infect banana. From all non-Moko disease-causing strains tested in phylotype IIB, all were able to established latent infection in banana, with the exception of members of phylotypes IIB-25, IIB-26, IIB-28, and IIB-51. Strain GMI1000 showed no pathogenicity to banana.

DISCUSSION

In this study, we assessed genetic diversity, phylogeny, and pathogenicity traits challenging different *Solanaceae* spp. and banana with a set of strains of *R. solanacearum* from EuMr. These strains were mainly isolated from diseased potato plants from the field or quarantined by national plant health inspection services. Results showed a greater diversity than expected from the literature, especially regarding host range and pathotype of potato strains that clustered into phylotype II (10).

From the phylogenetic analysis of partial *egl* gene sequences and from the organismal phylogeny (16), it was evident that strains from *R. solanacearum* species complex phylotype II encompassed strains with both broad and narrow host ranges (11). Strains showing the narrowest host range belonged to ecotypes Moko (banana and heliconia) and brown rot (potato and tomato). These ecotypes have a much narrower definition reflected in their genetic diversity as well-described sequevars (IIB-1, IIB-2, IIA-6, IIA-24, IIB-3, and IIB-4), whereas broad host range strains are scattered among phylotype II. Based on the phylogenetic tree presented in this study, strains that cause BW on *Solanaceae* spp. distributed in all phylotypes (I, IIA, IIB, III, and IV), just as potato-pathogenic strains showed a wide range of aggressiveness

and virulence (Table 6), mirroring a wide genetic basis for pathogenicity on these hosts. Most remarkable were virulence patterns of strains clustering into the Moko disease-causing phylotypes IIB-3 and IIB-4; although isolated from *Musa* spp. and pathogenic to banana, most strains were virulent to susceptible potato and tomato cultivars but not to eggplant, and phylotype IIB-4 strains were found to be virulent on resistant tomato Hawaii7996. The Moko disease-causing phylotype IIA-6, RUN394, was the only strain virulent to tomato, compared with the two other strains of the same phylotype in the time course of the experiment. Thus, in our experimental conditions, most banana strains inoculated to susceptible potato and tomato clustered into same pathogenicity cluster along with GMI1000, the model strain virulent on a wide range of *Solanaceae* spp. (32), including MolK2, the sequenced model genome of Moko disease-causing IIB-3 strains (15). As expected, the BDB strain R229 that clustered into the phylotype IV-10 was only pathogenic to banana.

It is noteworthy that experimental conditions applied in these experiments (injured roots and high concentration of inoculum) were in favor of BW development. Nevertheless, some Moko disease-causing strains were able to neither establish latent infection on *Solanaceae* spp. nor develop wilt. To our knowledge, no Moko disease-causing strains have ever been isolated from a wilted tomato or potato in the field, although it is now apparent that they were able to establish infections in these hosts. The three exceptions in our study were the phylotype IIB-2 strain CFBP1410 isolated from plantain (cooking banana) in Colombia, which established latent infection into banana; the phylotype IIB-3 strain CIP418 isolated from peanut in Indonesia that wilted banana; and the phylotype IIB-3 strain UW28 isolated from potato that lacked pathogenicity on all plant species tested but still clustered in a Moko disease-causing phylotype.

As reported by Fegan and Prior (11), the polyphyletic nature of Moko disease-causing strains of *R. solanacearum* is evidenced by the observation that strains are found within phylotype IIA (sequevar 6) and phylotype IIB (sequevars 3 and 4). All Moko disease-causing strains in this study that were no more pathogenic to banana also lacked pathogenicity to tomato. This suggests a loss of major determinants in mechanisms governing patho-

TABLE 4. Pathogenicity to tomato and eggplant of nonexotic strains of *Ralstonia solanacearum*, grown under different temperatures in security level NS2-Rotoplan^a

| Strain | Phylotype | Hot ^b | | | | | | | | Cold ^c | | | | | | | |
|-----------|-----------|------------------|---------|------------|---------|-------|--------|-----|--|-------------------|---------|------------|--------|-------|--------|-----|-------------------|
| | | L390 | | Hawaii7996 | | MM960 | | Clu | | L390 | | Hawaii7996 | | MM960 | | Clu | Glob ^d |
| | | w | CI | w | CI | w | CI | | | w | CI | w | CI | w | CI | | |
| PSS4 | I-15 | 10/8 | 100/90 | 5/0 | 50/10 | 10/0 | 100/80 | A/B | | 4/8 | 50/80 | 0/0 | 0/0 | 1/0 | 20/30 | B/B | B/B |
| GMI1000 | I-18 | 10/10 | 100/100 | 3/0 | 50/20 | 0/0 | 0/0 | B/B | | 7/0 | 70/10 | 0/0 | 20/0 | 0/0 | 0/10 | B/B | B/B |
| CFBP3858 | IIB-1 | 10/10 | 100/100 | 8/8 | 80/100 | 6/3 | 60/80 | A/A | | 9/6 | 100/90 | 8/0 | 80/70 | 3/0 | 70/50 | A/A | A/A |
| CFBP3870 | IIB-1 | 7/9 | 70/100 | 0/2 | 0/100 | 1/0 | 10/60 | B/A | | 2/3 | 20/50 | 1/0 | 10/10 | 5/0 | 50/20 | B/B | B/B |
| CFBP4787 | IIB-1 | 10/10 | 100/100 | 8/7 | 90/100 | 8/1 | 80/70 | A/A | | 9/10 | 100/100 | 10/3 | 100/60 | 9/0 | 100/70 | A/A | A/A |
| CMR34 | IIB-1 | 10/10 | 100/100 | 10/3 | 100/90 | 7/0 | 70/70 | A/A | | 10/10 | 100/100 | 9/2 | 100/70 | 8/0 | 80/50 | A/A | A/A |
| JT516 | IIB-1 | 6/9 | 80/100 | 9/5 | 90/80 | 5/0 | 60/50 | A/A | | 5/8 | 60/90 | 8/0 | 90/40 | 6/0 | 70/40 | A/A | A/A |
| LNPV28.23 | IIB-1 | 10/10 | 100/100 | 10/4 | 100/80 | 9/0 | 90/80 | A/A | | 10/10 | 100/100 | 9/5 | 90/80 | 9/0 | 90/80 | A/A | A/A |
| PSS525 | IIB-1 | 10/10 | 100/100 | 9/5 | 100/100 | 6/1 | 70/80 | A/A | | 8/10 | 90/100 | 8/0 | 90/80 | 5/0 | 80/60 | A/A | A/A |
| UW551 | IIB-1 | 10/10 | 100/100 | 3/2 | 100/100 | 5/0 | 70/90 | A/A | | 8/9 | 90/90 | 8/5 | 100/70 | 7/0 | 80/40 | A/A | A/A |
| CMR33 | III-20 | 7/0 | 70/10 | 0/0 | 0/0 | 0/0 | 0/10 | B/B | | 3/0 | 30/20 | 0/0 | 10/10 | 0/0 | 0/10 | B/B | B/B |
| CFBP3059 | III-23 | 10/7 | 100/100 | 10/0 | 100/20 | 0/0 | 0/40 | A/B | | 8/0 | 80/30 | 0/0 | 0/20 | 1/0 | 20/20 | B/B | B/B |
| DGBBC1138 | III-43 | 10/0 | 100/30 | 0/0 | 0/10 | 3/0 | 30/30 | B/B | | 1/1 | 20/70 | 0/0 | 0/0 | 1/0 | 10/0 | B/B | B/B |
| CMR66 | III-49 | 8/9 | 80/100 | 0/0 | 10/20 | 0/0 | 0/10 | B/B | | 5/1 | 50/40 | 0/0 | 10/0 | 0/0 | 0/10 | B/B | B/B |

^a Abbreviations: w = number of wilted plants out of 10 plants; colonization index (CI) = $N_{WP} + (N_S \times R_S)$, where N_{WP} = percentage of wilted plants, N_S = percentage of symptomless plants, and R_S = percentage of those asymptomatic plants sampled from which *R. solanacearum* was recovered; and Clu = clustering based on the CI and obtained by a fuzzy analysis clustering. Data organized as follows: replicate 1/replicate 2.

^b Hot conditions referred to a night and day temperatures of 24 and 30°C, respectively. Rand index validated, at hot tropical temperatures, two clusters: A and B (2 vs. 3 = 0.715; 2 vs. 4 = 0.367; 3 vs. 4 = 0.594; second replicate: 2 vs. 3 = 0.822; 2 vs. 4 = 0.455; 3 vs. 4 = 0.594).

^c Cold conditions referred to a night and day temperature of 15 and 24°C, respectively. Rand index validated, at cold temperatures, two clusters: A and B (2 vs. 3 = 0.729; 2 vs. 4 = 0.502; 3 vs. 4 = 0.502; second replicate: 2 vs. 3 = 0.775; 2 vs. 4 = 0.518; 3 vs. 4 = 0.518).

^d Glob = global clusters based on CI on both hot and cold temperatures computed after fuzzy analysis clustering. Rand index validated two clusters: A and B. A Rand index close to 1 validates the smallest clustering (2 vs. 3 = 0.729; 2 vs. 4 = 0.495; 3 vs. 4 = 0.728; second replicate: 2 vs. 3 = 0.729; 2 vs. 4 = 0.309; 3 vs. 4 = 0.391). Data organized as follow: replicate 1/replicate 2.

genicity for both the broad and narrow host range. Because we demonstrated that most strains pathogenic to banana were also pathogenic to potato and tomato, it is possible that other non-Moko disease-causing strains in each subcluster might have lost the ability to cause wilt on banana. Alternatively, horizontal gene transfer may have taken place between these two *R. solanacearum* lineages (IIA and IIB), allowing a non-banana-pathogenic organism to become a banana pathogen. In addition, some strains that were not isolated from any *Musaceae* maintained the ability to establish latent infections on banana, especially brown rot phylotype IIB-1 and IIB-2 strains and strain IBSBF1712 (IIB-27) isolated from pelargonium. Latent infections (i.e., the capacity of a strain to establish itself into the vascular tissues on a host [asymptomatic plant]) evidenced the conservation of an early step mechanism required for pathogenicity. When established as latent infections in a host, *R. solanacearum* strains may develop wilt or not (34), turning plant vasculature into an ecological niche of choice. On the one hand, from a phylogenetic point of view, closely related sequevars IIB-1, IIB-3, and IIB-4 address the question of host adaptation mechanisms which may have undergone a similar bottleneck evolution. On the other hand, from an epidemiological point of view and as regards actual cultural practice, IIB-1 brown rot strains that adapted to host cropped under a highland cold environment have almost no chance to meet with extensive tropical lowland crops, such as banana. In other words, a major finding of this work was to improve our understanding of the phenotype of *R. solanacearum* strains that are genetically and phylogenetically well characterized. A better understanding of pathogenicity traits, differentiating a nonhost versus susceptible or asymptomatic host, provides a relevant

frame to accurately approach underlying mechanisms for host speciation at the “omics” era.

Pathogenicity assessment of brown rot strains was congruent with the literature (25) and highlighted the fact that only phylotype IIB-1 strains maintain a high level of virulence regardless of temperature tested. Other strains, including the most closely related phylotype, IIB-2, and the phylogenetically distant African brown rot strains from phylotype III (24), although isolated from highland areas, dramatically decreased in virulence under cold temperatures. This indicates that the virulence factors for cold tolerance need further studies. In addition, because all IIB-1 strains that lack pathogenicity to potato under cold temperature were also weakly or not pathogenic under a tropical hot environment, it is anticipated that pathogenicity may have been altered in these strains. As expected from the literature, cold-tolerant EuMr strains isolated from wilted potato, tomato, or bittersweet were clonal and phylogenetically clustered into phylotype IIB-1, equivalent to R3bv2. Nonetheless, according to pathogenicity tests on *Solanaceae* spp., phenotypes statistically differed into different pathogenicity clusters. Since their first introduction decades ago in Europe, brown rot strains may have undergone genomic adaptation in local populations and were selected according to their fitness.

In our study, 101 of 106 strains originating or being intercepted in EuMr clustered into the brown rot phylotype IIB-1. Within the phylotype IIB-4NPB, we identified strain LNPV24.25 isolated in 2001 from a wilted tomato produced in a greenhouse in the southeast of France (Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Angers, *personal communication*), which indicates, to our knowledge, the first report of phylotype IIB-4NPB strain in

TABLE 5. Pathogenicity to tomato, eggplant and banana of exotic strains of *Ralstonia solanacearum* grown under tropical hot 24/30°C (night/day) temperatures in security level NS3-Rotoplan^a

| Strain | Origin, host | Phylotype | L390 ^b | | Hawaii7996 ^b | | MM960 ^b | | Cluster ^c | Banana ^d | |
|-----------|----------------------------------|-----------|-------------------|-----|-------------------------|----|--------------------|-----|----------------------|---------------------|-----|
| | | | w | CI | w | CI | w | CI | | w | CI |
| GMI1000 | French Guiana, tomato | I-18 | 7 (10) | 70 | 1 (0) | 10 | 0 (0) | 0 | B | 0 | 0 |
| GMI8044 | Grenada, banana | IIA-6 | 0 (0) | 0 | 0 (0) | 0 | 0 (0) | 0 | C | 0 | 80 |
| RUN394 | Grenada, banana Bluggoe | IIA-6 | 6 (6) | 90 | 0 (4) | 50 | 0 (0) | 20 | B | 5 | 100 |
| UW181 | Venezuela, banana plantain | IIA-6 | 0 (0) | 0 | 0 (0) | 0 | 0 (0) | 0 | C | 0 | 100 |
| CFBP2957 | Martinique, tomato | IIA-36 | 6 (9) | 80 | 0 (2) | 20 | 4 (0) | 60 | B | 0 | 100 |
| CMR34 | Cameroon, tomato | IIB-1 | 10 (8) | 100 | 5 (7) | 80 | 0 (0) | 60 | A | 0 | 80 |
| LNPV28.23 | Reunion, potato | IIB-1 | 10 (10) | 100 | 3 (8) | 70 | 9 (5) | 100 | A | 0 | 80 |
| UW551 | Kenya, <i>Pelargonium</i> sp. | IIB-1 | 10 (10) | 100 | 0 (1) | 40 | 4 (1) | 100 | A | 0 | 100 |
| CFBP1410 | Colombia, banana plantain | IIB-2 | 0 (0) | 30 | 0 (0) | 20 | 0 (0) | 50 | B | 0 | 100 |
| CFBP3879 | Colombia, potato | IIB-2 | 0 (0) | 10 | 0 (0) | 0 | 0 (0) | 0 | C | 0 | 80 |
| CFBP4611 | Colombia, potato | IIB-2 | 0 (0) | 10 | 0 (0) | 0 | 0 (0) | 0 | C | 0 | 80 |
| CFBP1416 | Costa Rica, banana plantain | IIB-3 | 0 (0) | 60 | 0 (0) | 20 | 0 (0) | 0 | B | 0 | 100 |
| CIP417 | Philippines, banana | IIB-3 | 5 (3) | 80 | 0 (0) | 0 | 0 (0) | 10 | B | 3 | 100 |
| CIP418 | Indonesia, peanut | IIB-3 | 2 (9) | 30 | 0 (0) | 10 | 0 (0) | 0 | C | 5 | 100 |
| Molk2 | Philippines, <i>Musa</i> sp. | IIB-3 | 6 (8) | 90 | 0 (0) | 0 | 0 (0) | 10 | B | 5 | 100 |
| UW28 | Cyprus, potato | IIB-3 | 0 (0) | 0 | 0 (0) | 0 | 0 (0) | 0 | C | 0 | 0 |
| UW9 | Costa Rica, <i>Heliconia</i> sp. | IIB-3 | 0 (3) | 50 | 0 (0) | 10 | 0 (0) | 10 | B | 0 | 100 |
| UW160 | Peru, banana plantain | IIB-4 | 9 (10) | 90 | 4 (3) | 60 | 0 (0) | 0 | B | 3 | 100 |
| UW163 | Peru, banana plantain | IIB-4 | 9 (9) | 90 | 4 (1) | 60 | 0 (0) | 10 | B | 5 | 100 |
| CIP10 | Peru, potato | IIB-25 | 2 (2) | 40 | 0 (0) | 0 | 0 (0) | 0 | C | 0 | 0 |
| IBSBF2001 | Brazil, tomato | IIB-25 | 7 (9) | 80 | 0 (5) | 30 | 0 (3) | 0 | B | 0 | 0 |
| CIP240 | Brazil, potato | IIB-26 | 5 (7) | 60 | 0 (0) | 40 | 0 (0) | 40 | B | 0 | 0 |
| IBSBF1712 | Brazil, <i>Pelargonium</i> sp. | IIB-27 | 10 (4) | 100 | 0 (0) | 20 | 0 (0) | 0 | B | 0 | 100 |
| NCPB3987 | Brazil, potato | IIB-28 | 3 (3) | 60 | 0 (0) | 0 | 0 (0) | 10 | B | 0 | 0 |
| CFBP7014 | Trinidad, anthurium | IIB-51 | 6 (5) | 100 | 1 (0) | 20 | 0 (0) | 40 | B | 0 | 0 |
| CFBP6783 | Martinique, <i>Heliconia</i> sp. | IIB-4NPB | 10 (10) | 100 | 6 (7) | 70 | 7 (7) | 80 | A | 0 | 0 |
| IBSBF1503 | Brazil, cucumber | IIB-4NPB | 10 (10) | 100 | 8 (8) | 90 | 7 (6) | 80 | A | 0 | 0 |
| LNPV24.25 | France, tomato | IIB-4NPB | 10 (9) | 100 | 5 (9) | 50 | 2 (2) | 20 | B | 0 | 0 |
| R229 | Indonesia, banana | IV-10 | 0 (0) | 0 | 0 (0) | 0 | 0 (0) | 0 | C | 5 | 100 |

^a Colonization index (CI) = $N_{WP} + (N_S \times R_S)$, where N_{WP} = percentage of wilted plants, N_S = percentage of symptomless plants, and R_S = percentage of those asymptomatic plants sampled from which *R. solanacearum* was recovered.

^b Number of wilted plants (w) out of 10 plants. Numbers in parentheses were scores obtained in an additional experiment (replicate) without investigating latent infection (no plant wilted but successful recovery of *R. solanacearum* on at least one plant).

^c Cluster = phenotypic groups based on the CI and obtained by a fuzzy analysis clustering. Rand index validated three clusters: A, B, and C. A Rand index close to 1 validates the smallest clustering (2 vs. 3 = 0.186; 2 vs. 4 = 0.413; 3 vs. 4 = 0.559).

^d Number of wilted plants (w) out of five plants.

France; however, the infection was contained and no outbreak has been surveyed during the past decade. These strains assigned to phylotype IIB-4NPB, reported as emergent in Martinique by Wicker et al. in the French West Indies (40), are phylogenetically undistinguishable from the Moko disease-causing phylotype IIB-4 strains by partial *egl* gene analyses. Phylotypes IIB-4NPB strains were highly virulent and aggressive and overcame resistance on *Solanaceae* spp. They were statistically clustered in the same pathogenicity group as the brown rot phylotype IIB-1 strains and were not pathogenic to banana. The origin of this emerging pathogen remains unsolved and its pathogenicity toward cultivated

Musa spp. may have been lost or never acquired (41). In addition to LNPV24.25 (IIB-4NPB), four others strains from EuMr did not cluster into phylotype IIB-1: (i) potato strain UW28 (Cyprus) clustered into the Moko disease-causing phylotype IIB-3, equivalent to the multilocus genotype group 24 (MLG24), reported by Cook and Sequeira (7); (ii) tomato strain CFBP4822 (Finland) clustered into the American phylotype IIB-7; (iii) potato strain PD1100 (Finland) clustered into the phylotype IIA-35; and (iv) potato strain UQRS607 (Iran) that was previously reported as phylotype IIB-25 (26). These strains showed that, despite the great proportion of brown rot phylotype IIB-1 strains in EuMr

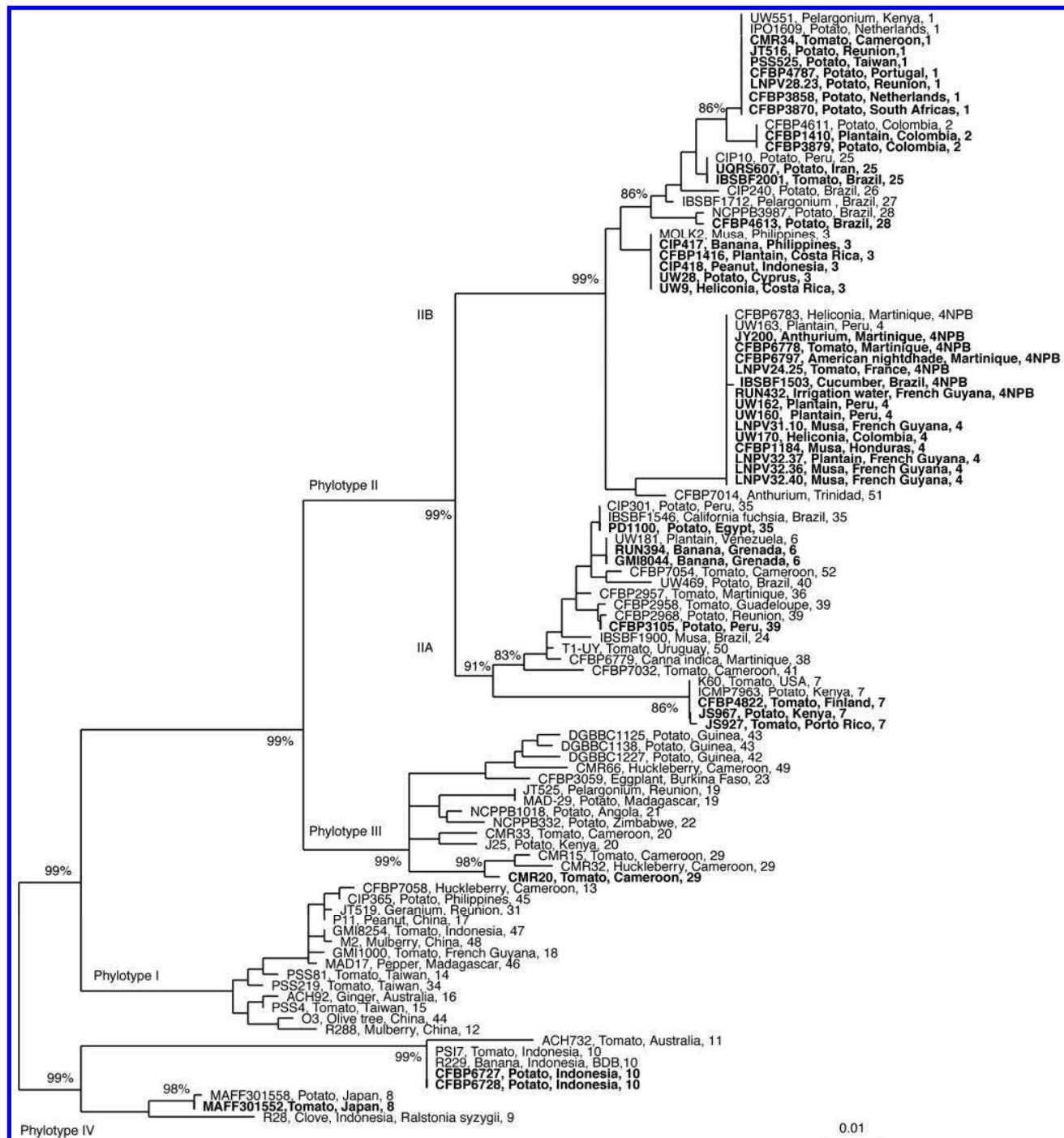


Fig. 1. Phylogenetic neighbor-joining tree based on partial sequences of the endoglucanase (*egl*) gene sequences of a subset of strains from different bacterial collections or intercepted by national plant health inspection services (in bold), and *Ralstonia solanacearum* species complex reference strains. The number at each node is the bootstrap value (2,000 resamplings), and only significant bootstrap values >80% are indicated. Scale bar represents 1 nucleotide substitution per 100.

TABLE 6. Summary of the temperature-related virulence on potato of phylogenetic groups of *Ralstonia solanacearum*^a

| Phylogenetic groups ^b | Hot | Cold |
|----------------------------------|-----|------|
| I | + | – |
| IIA | ± | – |
| IIA Moko | + | nd |
| IIB-1 Brown rot | + | + |
| IIB Moko | + | nd |
| III | + | – |
| IV | + | – |
| IV (BDB) | – | nd |
| IV (RSY) | – | – |

^a Virulence observed on potato at tropical hot (24 and 30°C, night and day, respectively) and temperate cold (15 and 24°C, night and day, respectively) temperatures; + = most of the strains tested (≥50%) are virulent; – = all strains tested are not virulent; ± = some of the strains tested are virulent; nd = not done.

^b BDB = blood disease bacterium and RSY = *Ralstonia syzygii*.

territory, other phylotypes may represent a potential threat to *Solanaceae* production. We also detected brown rot phylotype IIB-1 strains isolated from Anthurium and potato in Guadeloupe (French West Indies): LNPV27.43 and CFBP3880. respectively. Because R3bv2 was not reported from Guadeloupe (30), this suggests that these strains may be recently introduced.

In addition to deciphering pathogenicity traits, we described a set of three genetic resources that are useful in identifying pathogenicity clusters within *R. solanacearum* strains; namely, BW-susceptible tomato line L390, moderately resistant eggplant MM960, and highly resistant tomato Hawaii7996. Considering these three hosts, results showed that IIB-1 strains distributed into statistical clusters that gathered highly pathogenic and pathogenic phenotypes of strains according to their virulence and aggressiveness. This confirms and extends a previous report showing that no immunity or complete resistance was observed in any accessions in the *Lycopersicon* genus and relatives, facing IIB-1 strain JT516 (6).

These findings revealed that phylotype II strains share more virulence traits than expected from the literature, which is of major concern for investigating bacterial factors that control host or nonhost specificity, especially through post-genomic analysis of the *R. solanacearum* species complex.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the Fédération Nationale des Producteurs de Plantes de Pommes de Terre, Mission-DAR, Grant-7124 of the French Ministry of Food, Agriculture and Fisheries. The European Regional Development Fund (ERDF) of the European Union, Conseil Régional de La Réunion also provided financial support as part of Biorisk program developed at Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement. We thank M. Fegan, E. Wicker, J. C. De Cambiaire, and O. Pruvost for critical review before submission; F. Chiroleu for expertise in statistical analyses with R packages; J. M. Baptiste, J. J. Cheron, and S. Lebon for technical assistance; and institutions cited in the text for their courtesy in sharing strains of *Ralstonia solanacearum*.

LITERATURE CITED

- Alfano, J. R. 2009. Roadmap for future research on plant pathogen effectors. *Mol. Plant Pathol.* 10:805-813.
- Allen, C., Kelman, A., and French, E. R. 2001. Brown rot. In: Compendium of Potato Diseases. W. R. Stevenson, R. Loria, G. D. Franc, and D. P. Weingartner, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Ano, G., Hebert, Y., Prior, P., and Messiaen, C. M. 1991. A new source of resistance to bacterial wilt of eggplants obtained from a cross: *Solanum aethiopicum* L. x *Solanum melongena* L. *Agronomie* 11:555-560.
- Buddenhagen, I., Sequeira, L., and Kelman, A. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. (*Abstr.*) *Phytopathology* 52:726.
- Carmeille, A., Caranta, C., Dintinger, J., Prior, P., Luisetti, J., and Besse, P. 2006. Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylotype II resistance in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 113:110-121.
- Carmeille, A., Prior, P., Kodja, H., Chiroleu, F., Luisetti, J., and Besse, P. 2006. Evaluation of resistance to race 3, biovar 2 of *Ralstonia solanacearum* in tomato germplasm. *J. Phytopathol.* 154:398-402.
- Cook, D., and Sequeira, L. 1994. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In: *Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. A. C. Hayward and G. L. Hartman, eds. CAB International, Wallingford, UK.
- Eden-Green, S. J., and Adhi, E. M. 1986. Sumatra disease of cloves and *Pseudomonas solanacearum*. *Bacteriol. Wilt Newsl.* 1:2-3.
- Elphinstone, J. G. 2005. The current bacterial wilt situation: A global overview. In: *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum* Species Complex. C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward, eds. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
- Fegan, M., and Prior, P. 2005. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”. In: *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum* Species Complex. C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward, eds. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
- Fegan, M., and Prior, P. 2006. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. *Australas. Plant Pathol.* 35:93-101.
- Fegan, M., Taghavi, M., Sly, L. I., and Hayward, A. C. 1998. Phylogeny, diversity and molecular diagnostics of *Ralstonia solanacearum*. In: *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*. P. Prior, C. Allen, and J. Elphinstone, eds. INRA Editions, Paris.
- Granada, G., and Sequeira, L. 1983. A new selective medium for *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Dis.* 67:1084-1088.
- Grousset, F., Roy, A. S., and Smith, I. M. 1998. Situation of *Ralstonia solanacearum* in the EPPO region in 1997. *EPPO Bull.* 1-2:53-63.
- Guidot, A., Elbaz, M., Carrere, S., Siri, M. I., Pianzola, M. J., Prior, P., and Boucher, C. 2009. Specific genes from the potato brown rot strains of *Ralstonia solanacearum* and their potential use for strain detection. *Phytopathology* 99:1105-1112.
- Guidot, A., Prior, P., Schoenfeld, J., Carrere, S., Genin, S., and Boucher, C. 2007. Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *J. Bacteriol.* 189:377-387.
- Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:67-87.
- Hayward, A. C. 1994. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: *Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. A. C. Hayward and G. L. Hartman, eds. CAB International, Wallingford, UK.
- Hayward, A. C. 2000. *Ralstonia solanacearum*. In: *Encyclopedia of Microbiology*. J. Lederberg, ed. Academic Press, San Diego, CA.
- Janse, J. D. 1996. Potato brown rot in western Europe—history, present occurrence and some remarks on possible origin. *EPPO Bull.* 26:17.
- Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693-695.
- Lambert, C. D. 2002. Agricultural Bioterrorism Protection Act of 2002: Possession, Use, and Transfer of Biological; Agents and Toxins; Interim and Final Rule. *Fed. Regist.* 67:76907-76938.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jöb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lussmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., and Schleifer, K. H. 2004. ARB: A software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32:1363-1371.
- Mahbou Somo Toukam, G., Cellier, G., Wicker, E., Guilbaud, C., Kahane, R., Allen, C., and Prior, P. 2009. Broad diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon. *Plant Dis.* 93:1123-1130.
- Milling, A., Meng, F., Denny, T. P., and Allen, C. 2009. Interactions with hosts at cool temperatures, not cold tolerance, explain the unique epidemiology of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Phytopathology* 99:1127-1134.
- Nouri, S., Bahar, M., and Fegan, M. 2009. Diversity of *Ralstonia solanacearum* causing potato bacterial wilt in Iran and the first record of phylotype II/biovar 2T strains outside South America. *Plant Pathol.* 243-249.
- Poussier, S., Vandewalle, P., and Luisetti, J. 1999. Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hrp gene region. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2184-2194.
- Prior, P., Bart, S., Leclercq, S., Darrasse, A., and Anais, G. 1996. Resistance to bacterial wilt in tomato as discerned by spread of *Pseudomonas (Burholderia) solanacearum* in the stem tissues. *Plant Pathol.*

- 45:720-726.
29. Prior, P., and Fegan, M. 2005. Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. Acta Hort. 695:127-136.
30. Prior, P., and Steva, H. 1990. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from the French West Indies. Plant Dis. 74:13-17.
31. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
32. Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J. C., Cattolico, L., Chandler, M., Choisine, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguiet, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J., and Boucher, C. A. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. Nature 415:497-502.
33. Scott, J. W., Wang, J. F., and Hanson, P. M. 2005. Breeding tomatoes for resistance to bacterial wilt, a global view. In: Proc. First Int. Symp. Tomato Dis. M. T. Momol, P. Ji, and J. B. Jones, eds. International Society Horticultural Science, Brugge, Belgium.
34. Swanson, J. K., Yao, J., Tans-Kersten, J., and Allen, C. 2005. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium. Phytopathology 95:136-143.
35. Thoquet, P., Oliver, J., Sperisen, C., Rogowsky, P., Prior, P., Anaïs, G., Mangin, B., Bazin, B., Nazer, R., and Grimsley, N. 1996. Polygenic resistance of tomato plants to bacterial wilt in the French West Indies. Mol. Plant-Microbe Interact. 9:837-842.
36. Timms-Wilson, T. M., Bryant, K., and Bailey, M. J. 2001. Strain characterization and 16S-23S probe development for differentiating geographically dispersed isolates of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. Environ. Microbiol. 3:785-797.
37. Trigalet, A., Trigalet-Demery, D., and Feuillade, R. 1998. Aggressiveness of French isolates of *Ralstonia solanacearum* and their potential use in biocontrol. EPPO Bull. 28:101-107.
38. van der Wolf, J. M., Bonants, P. J. M., Smith, J. J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., van Beckhoven, J. R. C. M., Saddler, G. S., Trigalet, A., and Feuillade, R. 1998. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* race 3 in Western Europe determined by AFLP, RC-PFGE and Rep-PCR. In: Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects. P. Prior, C. Allen, and J. Elphinstone, eds. Springer Verlag, Berlin.
39. Wang, J.-F., Olivier, J., Thoquet, P., Mangin, B., Sauviac, L., and Grimsley, N. H. 2000. Resistance of tomato line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. Mol. Plant-Microbe Interact. 13:6-13.
40. Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., Guilbaud, C., Fegan, M., and Prior, P. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. Appl. Environ. Microbiol. 73:6790-6801.
41. Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., and Prior, P. 2009. Epidemiological evidence for the emergence of a new pathogenic variant of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies). Plant Pathol. 58:853-851.
42. Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., and Nishiuchi, Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. Nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. Microbiol. Immunol. 39:897-904.

Conclusions partielles

Cette étude a porté sur la caractérisation approfondie d'une sélection de 129 souches provenant de collections de *R. solanacearum* représentatives soit des foyers de flétrissement bactérien en régions européennes et méditerranéennes, soit de souches interceptées à l'entrée de la Zone Euro. Nous en avons fait une analyse comparative en y associant 57 souches de références internationales, afin d'en décrire la diversité génétique et d'assigner aux souches leur groupe phylogénétique en espérant associer ces groupes à la description de différents pathotypes insoupçonnés.

Dans un premier temps, l'arbre phylogénétique obtenu à partir du séquençage partiel du gène de l'endoglucanase (*egl*) a confirmé le caractère clonal des souches de l'écotype Brown rot de phylotype IIB-1. Ces souches regroupent aussi 101 des 106 souches d'origine européenne ou méditerranéenne ; les 5 souches qui n'entrent pas dans ce cluster sont : CFBP4822 (IIA-7) isolée de la tomate en Finlande ; PD1100 (IIA-35) isolée de la pomme de terre d'Égypte ; UW28 (IIB-3) isolée de pomme de terre de Chypre ; UQRS607 (IIB-25) isolée de pomme de terre d'Iran ; et LNPV24.25 (IIB-4NPB) isolée de la tomate sous serre en France.

Les résultats de pathogénie montrent que des souches distribuées dans les quatre phylotypes sont capables de flétrir la pomme de terre et qu'il existe une différence significative de l'agressivité et de la virulence sur ce même hôte des souches appartenant au sequevar IIB-1 (Brown rot). Les résultats publiés montrent aussi clairement la capacité insoupçonnée des souches pathogènes du bananier (écotype Moko) assignées dans les phylotypes IIA-6, IIB-3 et IIB-4, à flétrir la pomme de terre ainsi que les ressources génétiques sensibles en tomate. En complément ces souches peuvent établir des infections latentes dans les ressources génétiques résistantes en tomate et aubergine. Inversement, les données expérimentales montrent que l'écotype Brown rot dans le phylotype IIB-1 a conservé la capacité d'induire des infections latentes chez le bananier.

La distribution de souches qui flétrissent la pomme de terre dans les quatre phylotypes du complexe d'espèces *R. solanacearum* implique une large base génétique pour le pouvoir pathogène sur cet hôte. Néanmoins, les souches retrouvées en Europe et dans le bassin méditerranéen sont majoritairement associées au cluster IIB-1 et dans notre étude, seules cinq souches de collection se distinguent de ce cluster dont deux ont attiré notre attention : UW28, souche isolée de pomme de terre, appartenant à un groupe de souche censé n'héberger que des souches banane, dites Moko IIB-3 ; la souche LNPV24.25 isolée de tomate en France appartient au sequevar IIB-4NPB. Ainsi, le nouvel outil de classification a

permis de détecter LNPV24.25 qui est originale, car elle appartient au cluster de souches émergentes. Ce groupe de souches a été décrit précédemment en Martinique et il est hautement agressif sur *Solanaceae*, mais pas sur bananier (non pathogène du bananier). Il s'agit là de la première description d'une souche relative au groupe émergent des sequevars 4NPB sur le territoire métropolitain. De la même manière UW28 bien qu'isolée d'une Solanée appartient à un groupe inattendu, car censé n'accueillir que des souches inféodées à la banane (écotype Moko IIA-6). Cependant, la possibilité des souches de l'écotype Moko à flétrir les *Solanaceae* explique que l'on a pu isoler une de ces souches sur *Solanaceae* (alors qu'une erreur d'étiquetage avait été avancée).

Comme il est discuté dans l'article, toutes les conditions d'expérimentations étaient réunies pour la meilleure expression du pouvoir pathogène des souches (températures tropicales, humidité saturante, inoculum fortement dosé, blessures du système racinaire) ; cependant, malgré ces conditions expérimentales assumées, certaines souches dans ces écotypes n'ont pas donné lieu à des flétrissements ni à des infections latentes sur *Solanaceae* alors que dans le même temps leur pouvoir pathogène était bien vérifié sur le bananier. Par ailleurs, la souche provoquant la maladie du sang du bananier (BDB) n'a produit un flétrissement que sur le bananier.

Ceci pose néanmoins la question de l'adaptation des souches à l'hôte puisque certaines d'entre elles n'ont montré aucune virulence sur *Solanaceae* ou sur *Musaceae*, malgré un phénotype muqueux, suggérant la perte de déterminants majeurs dans les mécanismes gouvernant le pouvoir pathogène sur une gamme d'hôtes large ou restreinte. Il est aussi envisageable que les souches des autres clusters proches de l'écotype Moko aient perdu la capacité à flétrir la banane ou que des remaniements du génome aient opéré entre les phylotypes IIA et IIB, conférant à une souche non pathogène de la banane, le pouvoir pathogène sur cet hôte. Néanmoins, la capacité des souches Brown rot à provoquer des infections latentes sur bananier montre la conservation de mécanismes d'infections primaires requis pour l'expression du pouvoir pathogène.

Du point de vue de la phylogénie, Fegan et Prior (2005) avaient évoqué la possibilité que les positions relatives des souches des phylotypes IIB-1, IIB-3, et IIB-4 - très proches tout en étant phénotypiquement très éloignées – pouvait être expliqué par un phénomène de cul-de-sac évolutif sous la contrainte d'un hôte unique. Or, la description originale de ces véritables passerelles phénotypiques entre ces souches capables d'envahir les tissus des *Musaceae/Solanaceae*, doit nous permettre de s'interroger sur la nature des mécanismes évolutifs impliqués. Même si, d'un point de vu basé sur l'épidémiologie et les pratiques culturelles, les souches IIB-1 géolocalisées sur les hauts plateaux n'ont qu'une infime probabilité de concerner une culture extensive tropicale telle que le bananier – et

inversement – certaines de ces souches ont bien conservé le potentiel d’infecter chacun de ces hôtes particuliers et on été isolées sur un hôte inattendu (UW28).

Dans ce travail, il apparaît donc pour l’essentiel qu’aucun groupe phylogénétique, voire aucun écotpe dont on sait que la base génétique est étroite, ne pouvait être rigoureusement corrélé à des traits particuliers du pouvoir pathogène, principalement l’adaptation à un hôte particulier. L’exception est sans doute les souches *R. syzygii* et l’agent du BDB qui sont totalement inféodés à leur hôte. Ceci suggère très fortement un mécanisme de spéciation gouverné par des cycles d’apparition et de sélection purificatrice de complexes clonaux qui devraient émerger au sein même des différents écotypes, à la faveur d’alternance d’efficacité des différents mécanismes de mutations/recombinaisons qui pourraient s’exercer sur le génome selon des contraintes qui nous échappent encore largement.

Une conclusion décisive de ce travail a été d’améliorer les connaissances des souches de *R. solanacearum* en tant qu’espèce biologique et non plus uniquement au plan de la diversité génétique, en consentant un effort important à revisiter le pathotype de nombreuses souches censées être bien connues. Ces connaissances orientent vers une meilleure appréhension des mécanismes sous-jacents de la spécialisation d’hôte et placées en relation avec notre approche génomique, doivent permettre d’optimiser l’analyse des données de caractérisation postgénomique de l’agent pathogène *R. solanacearum*.

CHAPITRE 4 : GENOMIQUE COMPARATIVE DU COMPLEXE D'ESPECES

CHAPITRE 4

GENOMIQUE COMPARATIVE DU COMPLEXE D'ESPECES

Les premiers travaux de génomique sur le pathosystème *R. solanacearum* / tomate ont porté sur la souche GMI1000 qui a été choisie comme souche modèle (Salanoubat, Genin, *et al.*, 2002). GMI1000 appartient au phylotype I-18 et se caractérise comme une souche polyphage à large spectre d'hôtes. Par la suite (2003-2005), trois autres souches ont été choisies pour couvrir une gamme d'hôtes plus restreinte : IPO1609 et UW551 pour le pathosystème *R. solanacearum* IIB-1 / pomme de terre (Gabriel, Allen, *et al.*, 2006; Guidot, Elbaz, *et al.*, 2009), souches isolées respectivement des Pays-Bas et du Kenya et Molk2, souche isolée en Indonésie pour le pathosystème *R. solanacearum* IIB-3 / bananier (Guidot, Elbaz, *et al.*, 2009).

Ces génomes mosaïques ont révélé une exceptionnelle diversité de structure et de contenu génétique, notamment acquise par de récents transferts horizontaux de gènes. Un grand nombre de gènes clés du pouvoir pathogène ont été identifiés ou vérifiés, comme la région Hrp et de nombreux effecteurs. Cependant, leurs mécanismes ne sont pas entièrement caractérisés et de nombreuses études sont encore nécessaires chez *R. solanacearum* pour comprendre le lien entre les phénotypes observés pour les écotypes identifiés et la machinerie génomique comprenant le contenu en gènes et leur régulation. Pour cela, la stratégie que nous avons envisagée consiste à travailler directement sur le contenu en gènes de *R. solanacearum*. Le point clef est que cet organisme est un agent pathogène ancestral et extrêmement diversifié, ce qui en fait un modèle de choix pour approcher les mécanismes moteurs d'évolution et de spéciation bactérienne. Des données de séquences complémentaires ont donc été recherchées afin :

- (i) De tester et identifier certains bouleversements génomiques (Coupat, Chaumeille-Dole, *et al.*, 2008; Eisen, 2000; Metzgar & Wills, 2000) ;
- (ii) De quantifier la fraction dite optionnelle du génome (mobilome) (Siefert, 2009), susceptible de subir des transferts au sein du complexe d'espèces voire au sein de la communauté bactérienne ;
- (iii) D'explorer la réorganisation éventuelle du génome dans une perspective de spéciation parasitaire (Preston, Haubold, *et al.*, 1998; Toft & Andersson, 2010).

L'accès aux données de génomiques les plus complètes possible chez *R. solanacearum* est envisagé en obtenant les séquences génomiques de nouvelles souches, en privilégiant celles qui couvriront au mieux les différentes branches des arbres phylogénétiques préétablis. Dans notre approche, la voie de la génomique a été construite autour du concept du pangéome, rassemblant l'ensemble des gènes d'une espèce. Dans le cadre de ma thèse, les données expérimentales obtenues seront valorisées par la mise au point d'un outil moléculaire à haut débit pour explorer le vivant : la puce à ADN.

Mes travaux précédents ont appuyé le choix des souches candidates au séquençage de nouveaux génomes complets, en complétant les travaux de Guidot et coll. (2007) ainsi que ceux de P. Prior sur l'*egl* (communication personnelle). Le séquençage a été pris en charge par le Génoscope (plateforme de génomique du CEA) dans le cadre d'un projet collaboratif. Pour aborder cette partie importante des travaux de thèse qui m'ont été confiés et acquérir les compétences d'annotateur expert, j'ai participé à la formation dispensée aux chercheurs bactériologistes du Cirad-Réunion par l'équipe bio-informatique (LabGeM) de la plateforme MaGe (MicroScope, Microbial Genome Annotation Platform) du Génoscope (Évry). Trois génomes ont été annotés en un temps record (11 mois) et ma contribution se situe en amont du séquençage, en prenant part au choix des souches, mais surtout lors de l'annotation des séquences et en prenant une part active aux discussions. Ce travail d'annotation était particulièrement important pour le déroulement de mes travaux de recherche sur le plan des enjeux à relever en matière d'exploration des différents génotypes et écotypes de *R. solanacearum*.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue internationale *BMC Genomics*.

Remenant, B., Coupat-Goutaland, B., Guidot, A., **Cellier, G.**, Wicker, E., Allen, C., Fegan, M., Pruvost, O., Elbaz, M., Calteau, A., Salvignol, G., Mornico, D., Mangenot, S., Barbe, V., Médigue, C., Prior, P. (2010). Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics*, 11, 379.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence

Benoît Remenant¹, Bénédicte Coupât-Goutaland^{†2}, Alice Guidot^{†3}, Gilles Cellier^{1,4}, Emmanuel Wicker¹, Caitilyn Allen⁵, Mark Fegan⁶, Olivier Pruvost¹, Mounira Elbaz³, Alexandra Calteau⁷, Gregory Salvignol⁷, Damien Mornico⁷, Sophie Manganot⁸, Valérie Barbe⁸, Claudine Médigue⁷ and Philippe Prior^{*9}

Abstract

Background: The *Ralstonia solanacearum* species complex includes thousands of strains pathogenic to an unusually wide range of plant species. These globally dispersed and heterogeneous strains cause bacterial wilt diseases, which have major socio-economic impacts. Pathogenicity is an ancestral trait in *R. solanacearum* and strains with high genetic variation can be subdivided into four phylotypes, correlating to isolates from Asia (phylotype I), the Americas (phylotype IIA and IIB), Africa (phylotype III) and Indonesia (phylotype IV). Comparison of genome sequences strains representative of this phylogenetic diversity can help determine which traits allow this bacterium to be such a pathogen of so many different plant species and how the bacteria survive in many different habitats.

Results: The genomes of three tomato bacterial wilt pathogens, CFBP2957 (phy. IIA), CMR15 (phy. III) and PSI07 (phy. IV) were sequenced and manually annotated. These genomes were compared with those of three previously sequenced *R. solanacearum* strains: GM1000 (tomato, phy. I), IPO1609 (potato, phy. IIB), and Molk2 (banana, phy. IIB). The major genomic features (size, G+C content, number of genes) were conserved across all of the six sequenced strains. Despite relatively high genetic distances (calculated from average nucleotide identity) and many genomic rearrangements, more than 60% of the genes of the megaplasmid and 70% of those on the chromosome are syntenic. The three new genomic sequences revealed the presence of several previously unknown traits, probably acquired by horizontal transfers, within the genomes of *R. solanacearum*, including a type IV secretion system, a rhi-type anti-mitotic toxin and two small plasmids. Genes involved in virulence appear to be evolving at a faster rate than the genome as a whole.

Conclusions: Comparative analysis of genome sequences and gene content confirmed the differentiation of *R. solanacearum* species complex strains into four phylotypes. Genetic distances between strains, in conjunction with CGH analysis of a larger set of strains, revealed differences great enough to consider reclassification of the *R. solanacearum* species complex into three species. The data are still too fragmentary to link genomic classification and phenotypes, but these new genome sequences identify a pan-genome more representative of the diversity in the *R. solanacearum* species complex.

Background

The rapidly accumulating complete genomes in databases provide unique opportunities to study relationships among organisms. Since DNA sequences are conserved between closely related organisms, comparative genomic

analyses are a powerful tool for understanding the complex evolutionary events in specific phylogenetic lineages.

R. solanacearum, formerly known as *Pseudomonas solanacearum* and *Burkholderia solanacearum*, is the causal agent of bacterial wilt [1]. This soil-borne vascular pathogen is widely distributed in tropical and subtropical climates and affects an unusually broad range of crops, including both monocot and dicot plants [2-4]. Many affected hosts are critical for developing countries

* Correspondence: philippe.prior@cirad.fr

⁹ INRA-CIRAD, UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical, Saint Pierre F-97410, La Réunion, France

[†] Contributed equally

Full list of author information is available at the end of the article

because of their strategic importance as cash crops or as subsistence foods like potato (*Solanum tuberosum*), tomato (*S. lycopersicum*), eggplant (*S. melongena*), cooking banana (*Musa spp.*) and peanut (*Arachis hypogea*). In the 1990s, potato brown rot strains of *R. solanacearum* historically known as race 3/biovar 2 (r3b2) were introduced in Europe and North America [5,6]. Due to their adaptation to tropical highland climates, these strains, which are more virulent at cool temperatures (~20°C) than tropical strains [7], may pose major threats in temperate zones. Therefore, *R. solanacearum* was listed as a quarantine organism in Europe and Canada and as a Bioterrorism Select Agent in the U.S. [8].

R. solanacearum and the closely related species *R. syzygii* (a pathogen of clove in Indonesia) and the banana blood disease bacterium (BDB) form a complex in the *R. pickettii* lineage [9-12]. This species complex includes thousands of genetically distinct strains that can differ from each other by more than 30%, and thus do not belong in the same species by conventional definition [13]. This species complex includes strains with broad and narrow host ranges, which are ecologically different as well: potato strains are cold-tolerant and banana strains are insect-transmitted, and with different geographic origins. Because *R. solanacearum* strains have been isolated from virgin jungle soils in both Asia and the Americas, the origin of the species complex is believed to predate the geological separation of the continents [14]. Based on analyses of the 16S-23S internal transcribed spacer (ITS) region, *egl* and *hrpB* genes and on comparative genomic hybridization (CGH), the *R. solanacearum* species complex is hierarchically classified in four phylogenetic groups called phylotypes, which reflect their origins as follows: Asia (phylotype I), the Americas (phylotype II), Africa (phylotype III) or Indonesia (phylotype IV, which includes *R. syzygii* and BDB) [15,16]. Each phylotype can be further subdivided into sequevars, or sequence variants, which may contain isolates with similar virulence patterns or common geographic origin [12].

Despite their considerable phylogenetic diversity, *R. solanacearum* strains are unified by their common pathology. All cause bacterial wilt disease, which is characterized by bacterial colonization of the plant xylem vessels to very high cell densities (10^9 - 10^{10} CFU/ml xylem fluid), vascular browning, stunting, wilting, and often rapid death [3]. The bacterium is transmitted by soil, surface water, and infected propagation materials like potato tubers or ornamental cuttings. It most commonly infects plants through the roots, but some strains are insect-transmitted [17]. Bacterial wilt is difficult to control because the bacterium survives for years in infested soils and weed hosts. Breeding for host resistance, the best management strategy is complicated by the pathogen's high genetic diversity. For example, tomatoes resistant to

R. solanacearum strains in one region are often susceptible to those in another [18].

Genome sequences of *R. solanacearum* strains can answer historic questions about what traits allow this bacterium to be such an aggressive and lethal pathogen of so many different plants, and to survive in such different habitats as soil, water, non-host plant rhizospheres and host xylem vessels. The bi-partite genome of *R. solanacearum* strain GMI1000 (phylotype I, sequevar 18) was sequenced and analyzed [19,20]. The genome has two replicons, called the chromosome and the megaplasmid, with a mosaic structure that implies many rearrangements and horizontal gene transfers. Several factors have been shown to contribute to bacterial wilt virulence, especially the type III secretion system (TTSS) and associated effectors [21], and production of extracellular polysaccharides and enzymes [22]. The GMI1000 genome encodes more than a hundred TTSS effectors or putative effectors [23]. Draft genomes are available for two additional *R. solanacearum* strains: IPO1609/UW551, which cause potato brown rot disease in cool-temperate climates and Molk2, which causes Moko disease of banana and plantain [24,25]. These respectively belong to phylotype IIB sequevar 1 (IIB-1) and sequevar 3 (IIB-3).

To better understand how this highly diverse and scattered species complex has evolved and diverged without losing its fundamental pathological qualities, we sequenced the genomes of three additional broad host range strains from other phylotypes, namely: American strain CFBP2957 (IIA-36), African strain CMR15 (III-29) and Indonesian strain PSI07 (IV-10). All were originally isolated from tomato. Their complete genomes were manually annotated and analyzed with the aim of investigating the conserved, variable, and specific gene repertoires of these strains and the three previously sequenced ones, with a special emphasis on genes involved in virulence and pathogenicity. In addition, the genomes of 51 *R. solanacearum* strains (including the six sequenced strains) were compared by CGH on a pan-genomic microarray. These comparative genomic approaches produced new insights into the evolution and taxonomy of the *R. solanacearum* species complex.

Results and Discussion

It has long been known that *R. solanacearum* is a highly heterogeneous group of strains and thus no one genome sequence could represent the entire species complex. Initial genomic studies revealed that *R. solanacearum* strains have a substantial backbone of common house-keeping and virulence functions, but also carry a divergent set of genomic modules that likely confer distinct ecological phenotypes and host specificity [19,24]. Comparing multiple bacterial genomes distributed around the phylogenetic tree was therefore essential to understand

the evolutionary driving forces and mechanisms that have produced such a phenotypically and genotypically diverse group. Four existing genome sequences represented phylotype I (tomato isolate GMI1000) and phylotype II (IPO1609/UW551 and Molk2, from potato and banana, respectively) [19,24,25]. The phylotype-sequevar subclassification system provided rational criteria for choosing more strains to sequence to cover significant additional diversity in the species complex. We therefore sequenced genomes of strains that cause bacterial wilt of tomato from Indonesia (PSI07, phylotype IV), Cameroon (CMR15, phylotype III), and the French West Indies (CFBP2957, phylotype II).

Overview of genomes of CFBP2957, CMR15 and PSI07

The two-replicon (chromosome and megaplasmid) genome architecture of these three tomato strains was identical to that found in the three previously sequenced strains. As in the GMI1000 genome [20], most -but not all- housekeeping genes were carried on the chromosome. However, the capture or creation of the megaplasmid by *Ralstonia* spp. appears to be an ancient event, since all strains in the *R. pickettii* lineage studied to date have two replicons (Lucas et al, unpublished). Moreover, CGH microarray analyses by Guidot et al. [16] established that both replicons have a long history of coevolution within the *R. solanacearum* species complex.

The sizes of the chromosomes and megaplasmids, and therefore the entire genome, are similar in all strains. The average genome size for the sequenced *R. solanacearum* strains was approximately 5.7 Mb including the chromosome (3.6 Mb) and the megaplasmid (2.1 Mb) (Table 1). Additional data on genome characteristics are provided in supplemental material [Additional file 1]. *R. solanacearum* strains CFBP2957, CMR15 and PSI07 had genome lengths of 5,683,402 bp, 5,606,288 bp and 5,593,041 bp, respectively, with a common average G+C content of 66.7% in both replicons. With an average pro-

tein coding density of 86.8%, chromosomes contained about 3500 predicted coding sequences (CDS), and megaplasmids contained about 1800. Only one rRNA operon was detected in each *R. solanacearum* genome, except in strains GMI1000 and CMR15, which had 4 and 3 rRNA operons, respectively. Additional ribosomal operons can permit faster adaptation to new environmental conditions by increasing protein synthesis capacity [26]. In CMR15, two rRNA operons were on the chromosome and one on the megaplasmid; GMI1000 has three on the chromosome and one on the megaplasmid. The three CMR15 rRNA operons were 99.5% identical at the nucleotide level. Fifty-nine, 49 and 56 tRNA genes were identified in strains CFBP2957, CMR15 and PSI07, respectively.

Automatic re-annotation of the *R. solanacearum* sequences in the public domain identified 517 additional coding sequences (CDS) in GMI1000 (263 on the chromosome and 254 on the megaplasmid [Additional file 2]). These newly identified genes, encoding mostly proteins of unknown function, were encoded 'RALS0' to distinguish them from previously-annotated CDS ('RSC' and 'RSp').

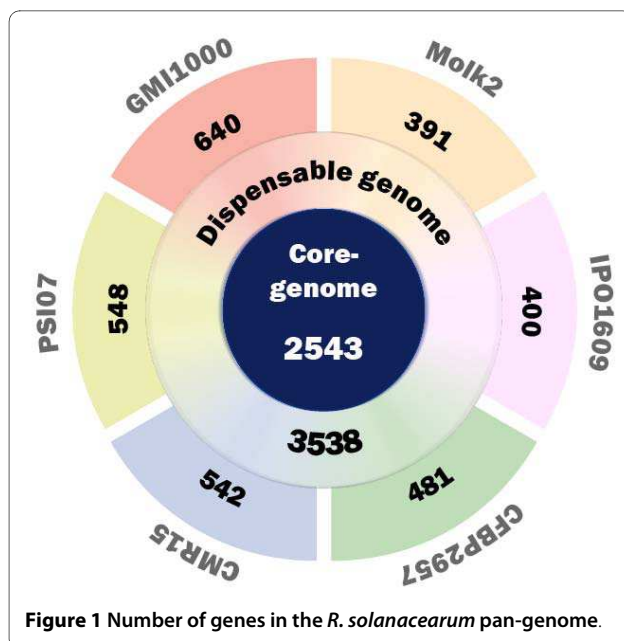
The *R. solanacearum* pan-genome

The new genome sequences from strains CMR15, CFBP2957 and PSI07 were combined with existing sequences from strains GMI1000, IPO1609, and Molk2 to identify a total of 9093 unigenes which constitute the known pan-genome of *R. solanacearum*: that is, the set of all genes present in a group of organisms. The pan-genome is composed of the core-genome (genes present in all strains), the dispensable genome (genes present in some strains, but not all) and the specific genome (unique genes present in only one strain) [27]. As reported in figure 1, among these 9093 genes, 2543 were highly conserved (bidirectional best hit (BBH)) in the six genomes and constituted the *R. solanacearum* core-genome, which

Table 1: General features of genomes of *R. solanacearum* strains CFBP2957, CMR15, PSI07, GMI1000, IPO1609 and Molk2

| | Phyl. | Geo. Ori. | length | GC% | #CDS | rRNA op | tRNA | Ref. strain | Ref. genome. |
|----------|-------|--------------------|-----------|-------|------|---------|------|-------------|--------------|
| CFBP2957 | IIA | French West Indies | 5,683,402 | 66.9% | 5310 | 1 | 56 | [55] | This study |
| CMR15 | III | Cameroon | 5,593,041 | 66.9% | 5149 | 3 | 59 | [56] | This study |
| PSI07 | IV | Indonesia | 5,606,288 | 66.3% | 5247 | 1 | 49 | [12] | This study |
| GMI100 | I | French Guyane | 5,810,922 | 67.0% | 5635 | 4 | 57 | [76] | [19] |
| IPO1609 | IIB | Nederland | 5,523,292 | 66.7% | 5203 | 1 | Na | [77] | [24] |
| Molk2 | IIB | Indonesia | 5,862,101 | 66.7% | 5438 | 1 | Na | [24] | [24] |
| Mean | | | 5,679,841 | 66.7% | 5330 | 1.7 | 47.3 | | |

Data for chromosomes and megaplasmids are combined. For more details, see Table S1. (Phyl. = phylotype, Geo. Ori = geographical origin, #CDS = number of coding sequences, rRNA op = number of rRNA operons, tRNA = number of tRNA, Na = Not available.)



thus makes up 28% of the pan-genome. Ninety-three percent of the core genome CDS were located on the chromosome. The dispensable genome contained 3538 genes (39% of the pan-genome). This is in general agreement with a previous conserved genome estimate of 2690 genes that was based on CGH analyses of 18 strains [16]. The overestimate by the CGH approach is probably due to nonspecific hybridizations and lower technical precision of hybridization compared to sequencing. The number of strain-specific genes was variable, ranging from 391 for Molk2 to 640 for GMI1000 (figure 1). For these six *R. solanacearum* strains, a total of 3012 genes were identified as strain-specific genes, which represents a third of the current pan-genome. Depending on the strain, the number of proteins of unknown function (or conserved proteins of unknown function) encoded by the strain-specific genes ranged from 73 to 84% in. These genes likely hold many clues to the traits and mechanisms underlying the biological diversity of the *R. solanacearum* species complex, but because so few of these CDS can be functionally annotated, gene by gene mutagenesis and phenotype analysis will be needed to determine their roles.

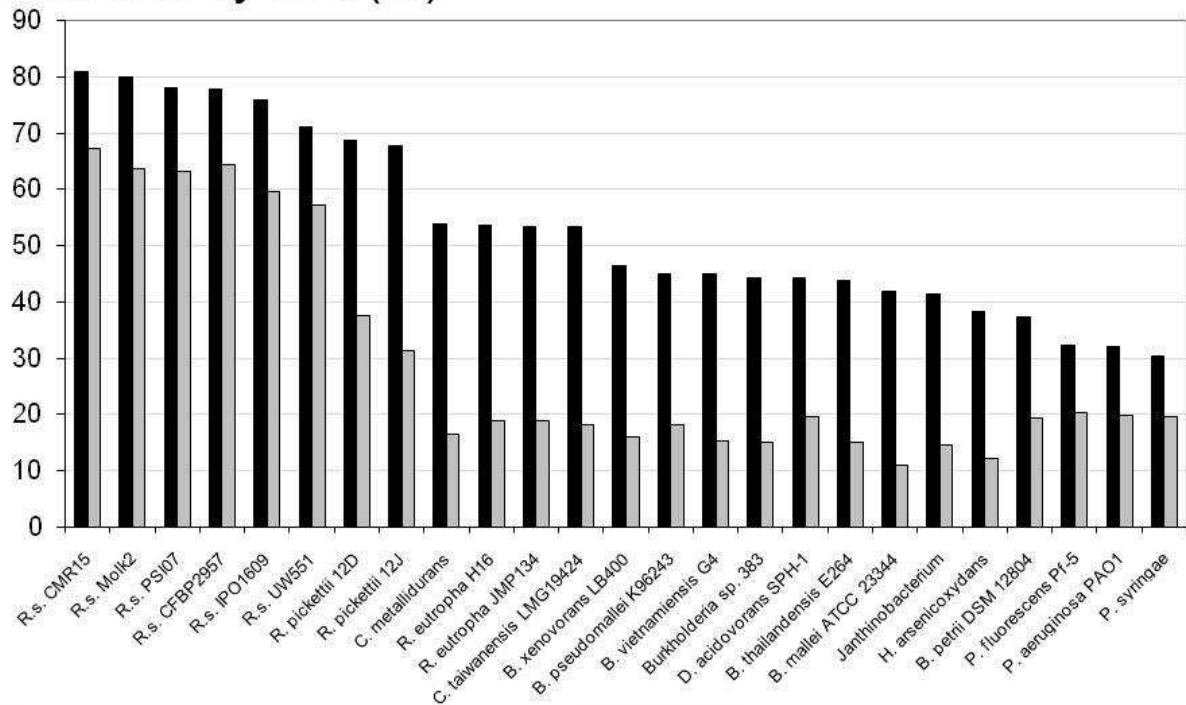
Genome plasticity and genomic islands

Working from the GMI1000 genome, we identified syntenic CDS in all six *R. solanacearum* genomes and also in some bacterial species most closely related to the *R. pickettii* lineage (figure 2A). The six *R. solanacearum* genomes were highly syntenic: 55 to 65% of the CDS on the megaplasmid and 70 to 80% of the CDS on the chromosome were in synteny. This percentage decreased to below 55% on the chromosome and 20% on the megaplasmid in

other closely related species, except for *R. pickettii*, where 68 and 40% of CDS, on the chromosome and the megaplasmid respectively, were in synteny with GMI1000. *R. pickettii* is closely related to, but not a member of the *R. solanacearum* species complex; both belong to the *R. pickettii* lineage (as distinct from the *R. eutropha* lineage) [9]. *Cupriavidus* spp. and *R. eutropha* are the closest relatives to the *R. pickettii* lineage, but in these genomes the number of CDS in synteny with GMI1000 was dramatically lower on both replicons. Further, the size of syntenic regions was greater within the *R. solanacearum* species complex; an average of 11 to 16 CDS per synton was observed on chromosomes of these strains (figure 2B, black bar). The exception was the African strain, CMR15, where we found an average of 25 CDS per synton with GMI1000. For the other related species, the mean number of CDS in one synton was fewer than 8. For all comparisons, we found that the megaplasmids always contained fewer CDS in synteny than the chromosomes. Multiple alignments of *R. solanacearum* genomes revealed that many genomic rearrangements occurred in the history of these organisms, including intra- and inter-replicon rearrangements (figure 3).

R. solanacearum is naturally competent for DNA transformation [28-30] which allows cells to acquire foreign genetic material directly from their environment. Nakamura et al [31] estimated that nearly 16% of GMI1000 genes were horizontally transferred. Genomic islands are parts of genomes that display evidence of horizontal acquisition. They have a minimal length of 5 kb and contain CDSs with no BBH and no synteny with genomes of compared organisms. Table S3 [Additional file 3] provides a complete list of the numerous genomic islands detected in CFBP2957, CMR15 and PSI07, and a schematic representation of genomic island locations is given in figure 4. The density of genomic islands was two-fold greater on megaplasmids than on chromosome. Many of these genomic islands were IS or phage sequences containing almost exclusively proteins of unknown function. However, some genomic islands carried type III effectors (or putative effectors), including, in CMR15: *GALA8*, an unknown effector, similar to other *GALA* effectors (GR1 on the chromosome); *popP2* (GR11 on the chromosome); as well as putative effectors (GR29 or GR32 on the megaplasmid). Two supplementary rRNA operons (GR12-chromosome and GR2-megaplasmid) and *nosZRDFYL*, an operon involved in the anaerobic denitrification pathway (GR12-megaplasmid) were also located on genomic islands in CMR15. In PSI07, three putative type III effectors were detected on chromosomal genomic islands (GR12 and GR31) and one on the megaplasmid (GR38). In CFBP2957, only two putative effectors were detected in genomic islands (GR4-chromosome and GR3-megaplasmid). These results are still too fragmentary to deter-

A - CDS in synton (%)



B - Mean number of CDS in 1 synton

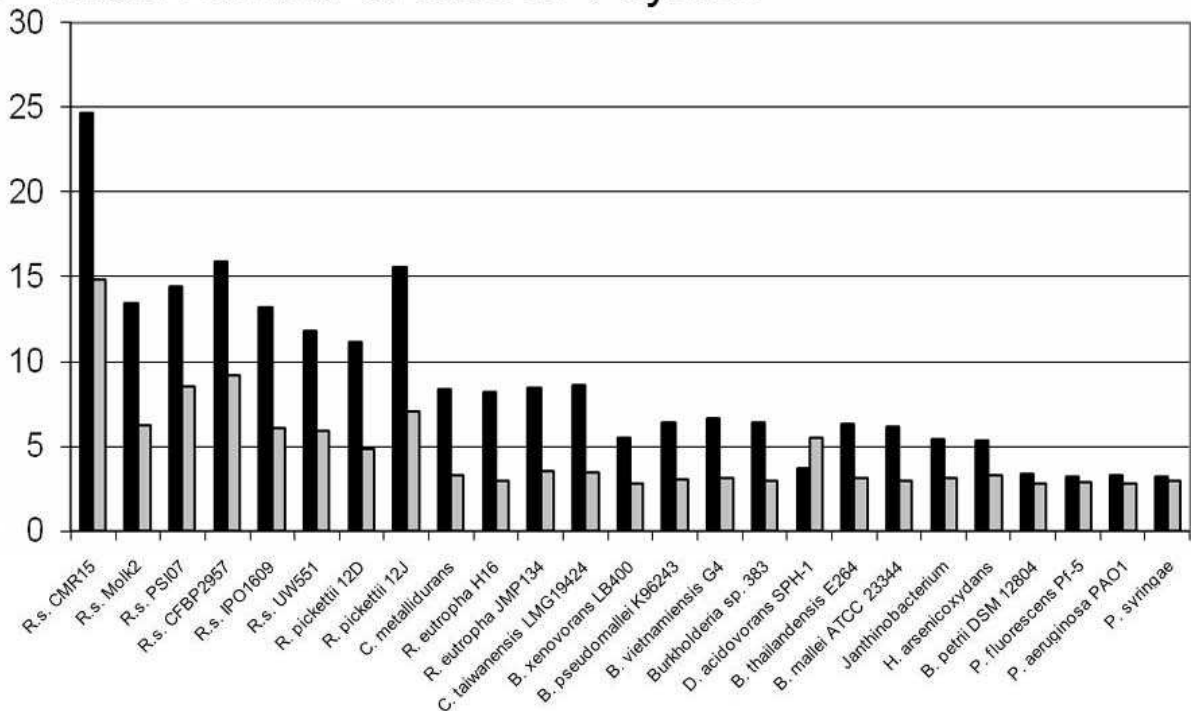


Figure 2 Synteny in the *R. solanacearum* species complex. Figure 2A shows the percentage of CDS in synteny in each strain compared with strain GMI1000. Figure 2B shows the mean number of CDS in 1 synton compared with GMI1000. Results for chromosome and megaplasmids are depicted in black and grey, respectively.

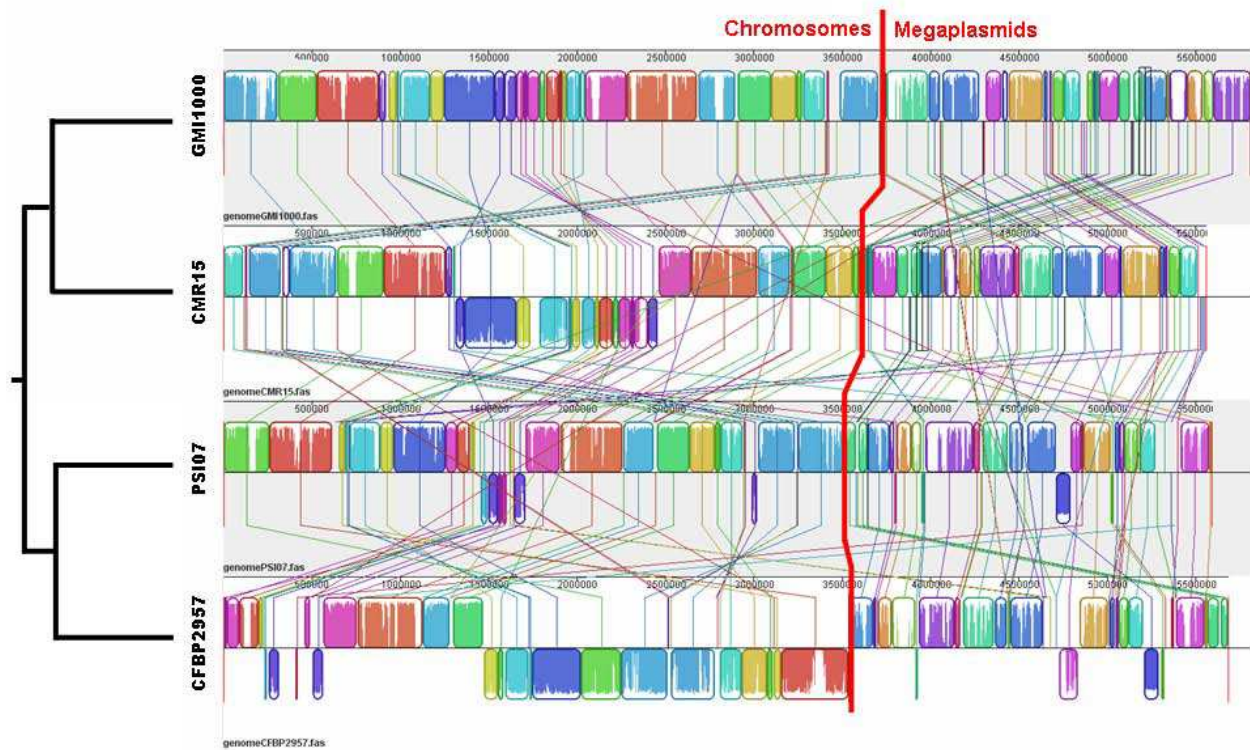


Figure 3 Multiple genome alignment for strains GMI1000, CMR15, PSI07 and CFBP2957. Fine colored lines represent rearrangements or inversions relative to the GMI1000 genome. Chromosomes are separated from megaplastids by the thick red line.

mine any relationship between host ranges and the presence or absence of repertoires of specific effectors. However, acquisition of new effectors could theoretically contribute to rapid adaptability and diversification, especially in virulence and aggressiveness, as well as to saprophytic fitness.

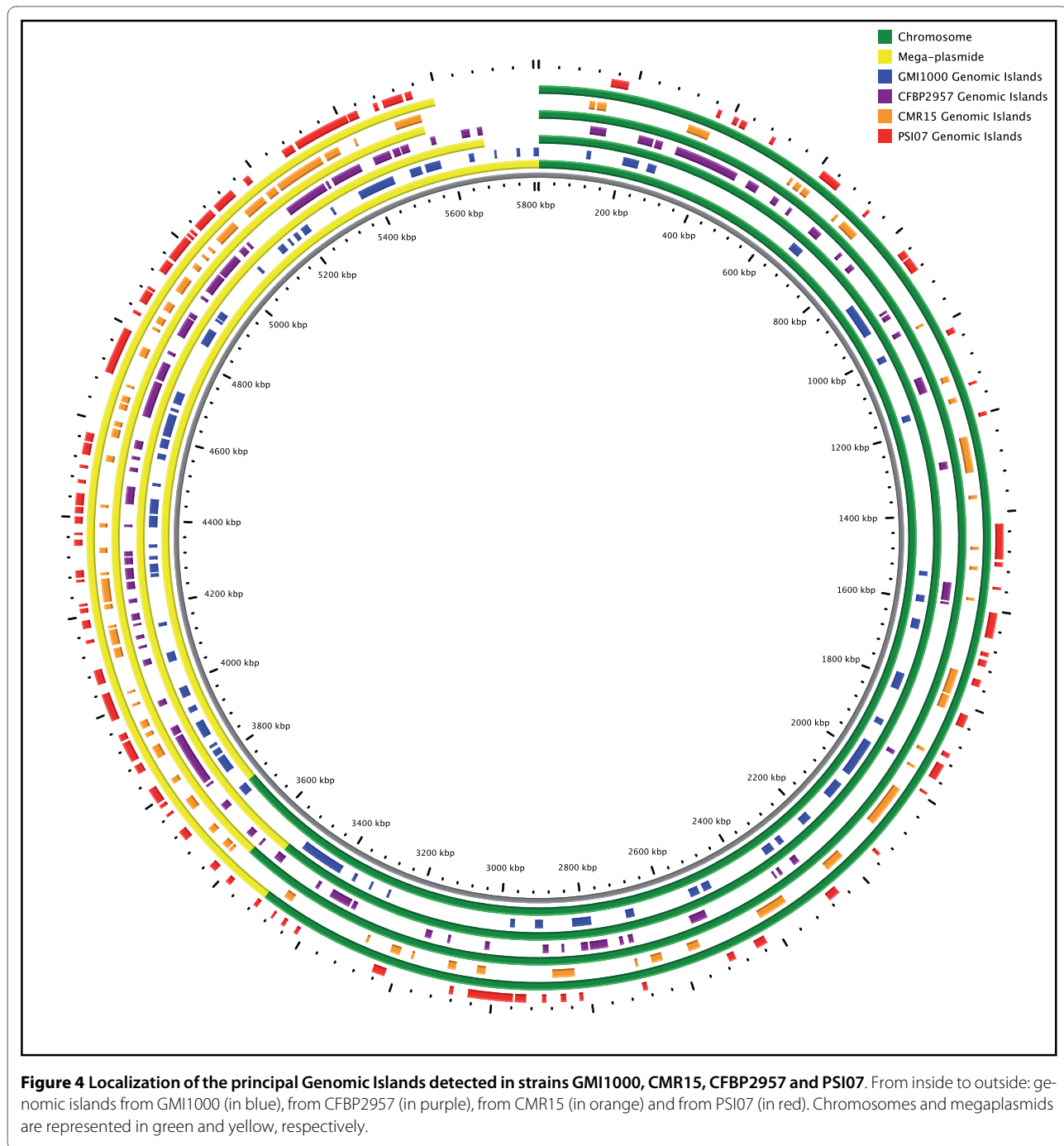
Interestingly, the megaplasmids of CFBP2957 and PSI07 also harbor a genomic island containing the *rhi* operon. This operon was composed of 9 genes: *rhiB* (20274 pb), *rhiC* (97185 pb), *rhiI* (867 pb), *rhiD* (12468 pb), *rhiH* (1458 pb), *rhiE* (12657 pb), *rhiF* (7824 pb), *rhiA* (7158 pb) and *rhiG* (1983 pb). The *rhi* genes were previously unknown in *Ralstonia* strains, but are present in *Pseudomonas fluorescens* [32] and in *Burkholderia rhizoxinica* where they encode a non-ribosomal peptide synthase (NRPS) that synthesizes the antimitotic toxin rhizoxin [33]. Although this operon spans more than 80 kb, it could have been horizontally acquired since *R. solanacearum* can exchange and integrate DNA fragments of 30 to 90 kb by natural transformation [29]. The insertion of such a toxin operon in the genome of *R. solanacearum* could provide a competitive advantage in the soil environment.

Comparison of some metabolic properties

To better understand metabolic diversity among the sequenced strains, we used Principal Components Analy-

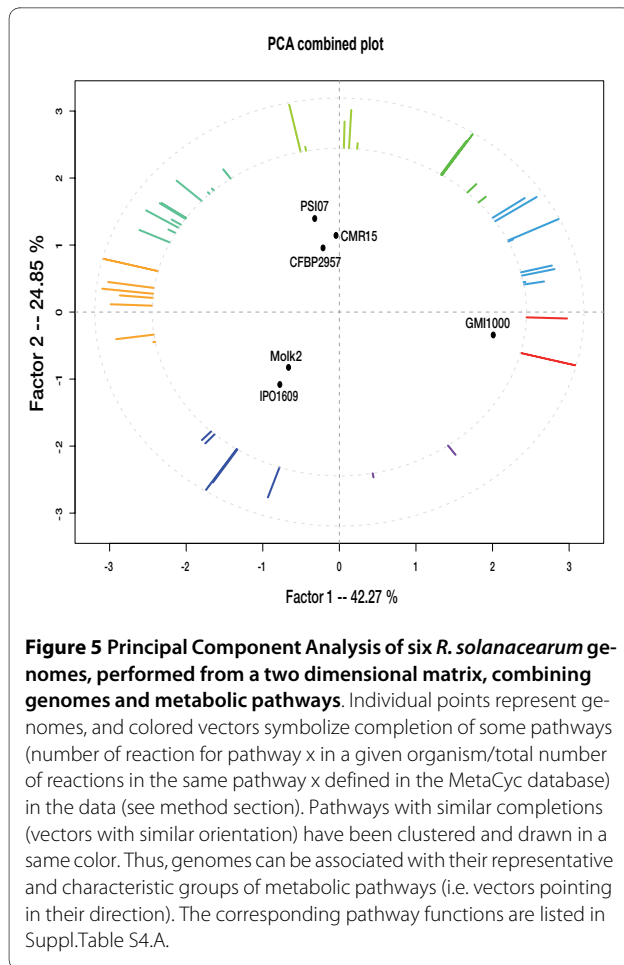
sis (PCA), a type of factorial analysis that analyzes a data matrix by several quantitative variables [34]. We applied PCA to a matrix describing the completion (measured as a percentage) of all known metabolic pathways present in the six *R. solanacearum* genomes (figure 5). The first two resulting factors captured over 67% of the data's total variability. The axes were interpreted with the help of external information, such as each strain's host, phylo-type, and the laboratory of annotation. The first factorial axis separated strain GMI1000 from the five other strains. This result accounted for the metabolic functions corresponding to the red-colored vectors. The list of pathways that these vectors represent can be consulted in Table S4 A and B [additional file 4], and generally have a maximum of two or three reactions. None of these pathways appear to be complete in GMI1000. This suggests that this factorial axis is in fact an artifact of insufficient or erroneous enzymatic function annotations. This should help guide future annotation efforts. The second factorial axis separated the strains according to their hosts: banana and potato for Molk2 and IPO1609, and tomato for PSI07, CMR15 and CFBP2957. As would be expected, Molk2 and IPO1609, which are close together in the factorial plane, actually belong to the same phylotype (IIB).

Careful examination of the metabolic potential of the studied genomes has revealed some specificity capabilities for compound degradation. Although *R. solan-*



acearum is a highly adapted and ancient plant pathogen, this organism can also survive well in soil and rhizospheres and, consequently, its genome encodes ability to metabolize diverse organic compounds as energy sources. Pathway analyses indicate that this bacterium can utilize a wide range of substrates including amino acids, sugars, and fatty acids as well as glycerol, ethanol, methylglyoxal, and beta-ketoadipate ([Additional file 4, sheet B], also Genin and Boucher [20]). GMI1000 was predicted to grow on various aromatic compounds

including ferulate, vanillate, and protocatechuate [20], which are released when lignin degrades in soil. However strains CMR15 and GMI1000 do not harbour the *ben-ABCD* and *catABC* genes involved in benzoate and catechol degradation to beta-ketoadipate. Another contrasting example is D-galactonate degradation, which can serve as energy and sole carbon source for many enteric bacteria [35]. In soil, bacteria such as *Azotobacter vinelandii* and *Sinorhizobium meliloti* convert D-galactose to D-galactonate via the De Ley-Doudoroff pathway,



and finally to D-glyceraldehyde-3-phosphate and pyruvate. Our data indicate that D-galactonate degradation is functional only in strains GMI1000, CMR15 and PSI07 [Additional file 4, sheet B]. However, this substrate must be taken up whole from the environment because no degradation enzymes upstream in the pathway were apparent in these genomes. Curiously, it seems that the D-galactonate transport system is different in CMR15, which harbors only one likely transport gene in the corresponding synton, and in GMI1000 and PSI07, which each have 3 genes highly similar to the L-arabinose ABC transporter (annotated as *araFGH*).

Urease, which is necessary for utilization of urea as sole nitrogen source, has three main subunits and five accessory proteins. Genetic determinants for this enzymatic activity were found in all strains except MolK2, the only banana wilt pathogen sequenced to date. All six strains appear able to metabolize inorganic nutrients such as sulfate and nitrate, consistent with experimental data [14]. However, the denitrification pathway was complete only in strains GMI1000 and CMR15, because the *nosZ* gene encoding nitrous oxide reductase was absent from the four other strains; this heterogeneity was previously

noted [25]. Genes for periplasmic nitrate reductase (*nap*), nitrate reductase (*nar*), nitric oxide reductase (*nor*) and nitrite reductase (*nir*) were present on the megaplasmids of all six sequenced *R. solanacearum* strains.

Finally, all six genomes contain genes involved in the detoxification of noxious compounds and in metal resistance, which likely support colonization and survival in specific ecological niches. An interesting example is arsenic resistance which in bacteria is mediated in part by *ars* genes. Among these, *arsC* encodes an arsenate reductase [As(V)TAs(III)], *arsA* and *arsB* encode an arsenite efflux pump, and *arsR* encodes a transcriptional regulator [36]. As(III) is known to induce oxidative stress, to cause DNA damage, and to inhibit the DNA repair system [37]. It is generally further oxidized by the arsenite oxidase [As(III)TAs(V)] encoded by *aoxAB* genes. The *arsC* gene is the sole gene in this pathway present in all six strains, with two tandem copies in PSI07. In addition, only PSI07 can oxidize arsenite: on the PSI07 megaplasmid is a cluster containing two *arsC* genes, *aoxAB*, and *arsR*. The annotation of the *arsC-like* gene is probably erroneous in the other *Ralstonia* species (and in many other bacterial genomes as well).

Virulence factors

Many traits contribute to virulence of *R. solanacearum* strains. The best known are the type III secreted effectors, well described in this bacterium and in other plant pathogens [23]. However, other traits, such as production of EPS and cell wall-degrading enzymes, are also important for wilt disease development. Based on the literature, we created an inventory of 128 genes involved in virulence from the six sequenced *R. solanacearum* genomes [Additional file 5: Supplemental Table S5]. Some genes are involved in swimming motility, twitching motility and chemotaxis. Table S5 gives a representative pair of genes for each of those functions. Virulence genes were subdivided into 5 categories: type III effectors (TTE) and putative effectors, the exopolysaccharide (EPS) biosynthetic genes, the cell wall-degrading enzyme (CWDE) genes, response to host defence genes and key virulence regulators. Scrutiny of the genomes shows that all six strains have all genes needed for functional type II and III secretion systems. Similarity distances between each sequenced strain were computed on the basis of gene presence/absence data for these 128 virulence genes (data not shown). Phylogenetic analysis constructed on the basis of: 1) all known or putative Type 3 effector genes in the pan-genome, and 2) all known virulence factor genes of all kinds in the pan-genome, resulted in trees that were significantly different from each other, and significantly different from trees based on well-conserved genes like *mutS* and *egl* sequences, or on the entire genome sequences (data not shown). This result suggests that vir-

ulence factor genes have evolved or been lost or added at substantially different rates than *R. solanacearum* genes as a whole. A more fine-scale case-by-case analysis will likely be needed to trace the evolutionary history of individual virulence traits. Analysis of strains hosted by plants phylogenetically distant from tomato (a common host for all strains analyzed here except Molk2) may elucidate roles of individual virulence factors in determining host range.

Type III-secreted effectors are an important potential source of host range variability in *R. solanacearum* strains; these have mainly been described in GMI1000 and UW551 to date [23,25]. Specific effectors that are important in CMR15, CFBP2957 and PSI07 are unknown. We attempted to detect new type III effectors with the Effective software [38], but this did not work well for *R. solanacearum* strains, giving about 50% false negative on previously annotated effectors (data not shown).

Plasmids in *Ralstonia solanacearum* strains

Genin and Boucher [20] suggested that the presence of small plasmids in *R. solanacearum* cells, initially described by Morales and Sequeira [39], was more an exception than a rule. However, we found small plasmids (<50 kb) in the African and Indonesian strains. These plasmids were named pRSC35 (35 kb, GC% = 61.3) in strain CMR15 and pRSI13 (12.8 kb, GC% = 61.0) in strain PSI07. The presence of small plasmids is therefore maybe less rare in *R. solanacearum* strains than previously thought. These small plasmids may have remained undetected until now because their very low copy number makes them difficult to purify (unpublished results).

Despite their low copy numbers, the stability of these plasmids is apparently ensured by two different toxin/antitoxin (TA) systems. On pRSC35, two CDS had a limited homology with zeta-toxin and epsilon-antitoxin (<40%), which form a post-segregational mechanism for plasmid maintenance in bacteria [40,41]. The regulator ω was not detected in the CMR15 genome. This zeta/epsilon TA system is well described and a similar system confers a bactericidal effect on *Bacillus subtilis*, and bacteriostatic effects on *E. coli* [42].

The plasmid pRSC35 was broadly syntenic with plasmids from many plant-associated bacteria including pXcB of *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* (65% of CDS in synteny), diverse *P. putida* plasmids (from 58 to 62% synteny), a *X. citri* pv. *citri* plasmid (58% synteny) and a plasmid from *X. euvesicatoria* (51% synteny). Among the 44 CDS present on this plasmid (figure 6A), 14 appeared to be involved in the Type IV secretion system: 10 genes make up the *virB* operon (*virB1*, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 and 11) ranging from 5 to 15 kbp, and four genes form the *tra* operon (*traA*, B, C and D) from 28 to 34 kbp. Eight CDS coded for proteins potentially involved in DNA metabo-

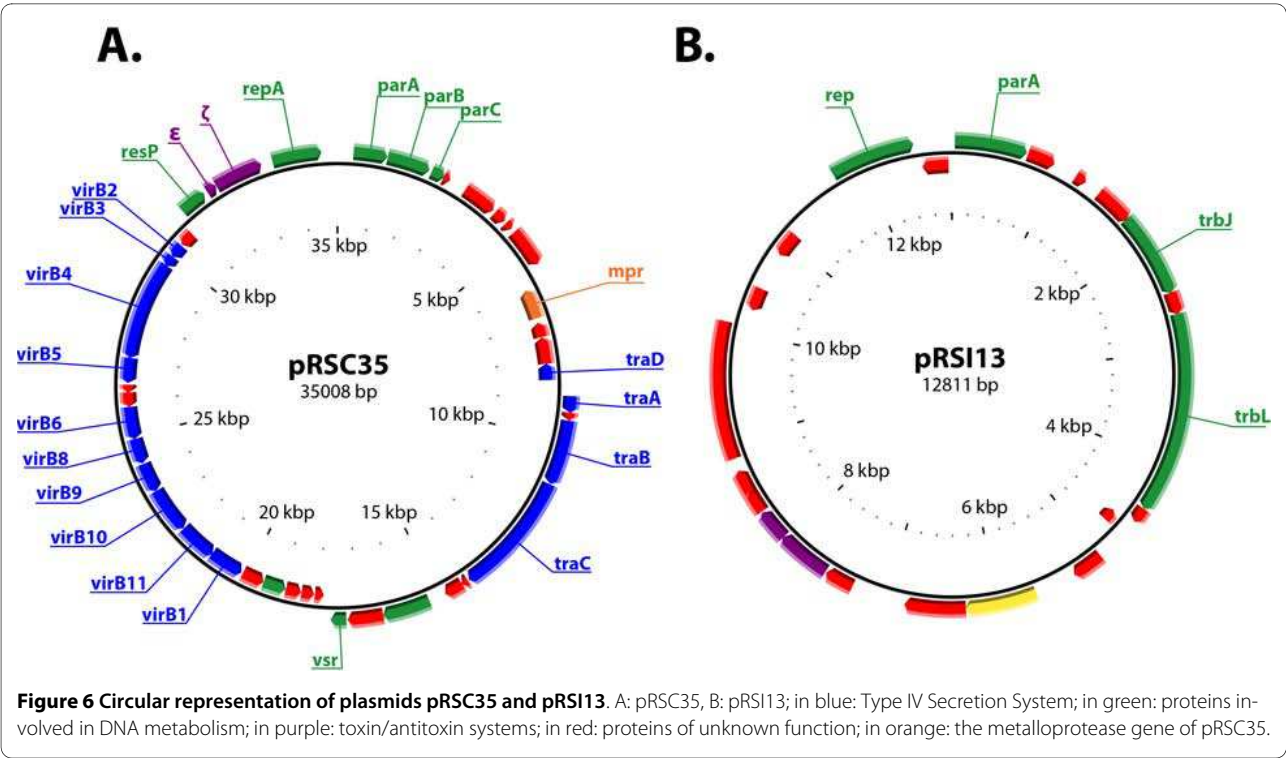
lism (such as partition proteins *parA*, *parB* and *parR*, a DNA methyltransferase, and a DNA mismatch endonuclease). Finally, one CDS had a strong homology to a Zn-metalloprotease (*mpr*), also carried on plasmids in several human and/or animal pathogenic bacteria or opportunistic bacteria: *P. putida*, *Yersinia pestis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, etc. Metalloproteases like those encoded on pRSC35 are essential for the infection process of many eukaryotes [43-46].

The unexpected Type IV Secretion System is unique among *R. solanacearum* strains studied to date and could play diverse important roles in virulence and adaptation. The CMR15 Type IV secretion system genes, which are clustered together with the *virB* operon, have nearly the same organization as on pXAC64 of *Xanthomonas citri* pv. *citri* [47]. The type IV secretion system is a bacterial conjugation apparatus [48] and the DNA thus efficiently imported through the cell envelope can directly increase the fitness or virulence of bacteria by mediating the acquisition of new traits like effectors or antibiotic resistance genes. Type IV secretion systems can also be directly involved in virulence via direct injection of effectors or DNA into plant cells [49,50]. No obvious type IV effectors were found on pRSC35 or in the complete genome of CMR15, but some proteins of unknown function could be Type IV effectors. Additional experiments are needed to investigate (i) the distribution of this plasmid in African phylotype III strains, (ii) the ecological and pathogenic role of this plasmid in the phenotype of phylotype III strain CMR15, and (iii) the occurrence of such plasmids in strains belonging to other phylotypes.

A second low-copy number plasmid, pRSI13, was present in PSI07. It was syntenic with a plasmid found in *Nitrobacter hamburgensis* X14 (34% of CDS in synteny), *Burkholderia pseudomallei* 9 and 91 (30 and 26% respectively), *Parvibaculum lavamentivorans* DS-1 (26%), *Acidovorax* sp. JS42 (26%) and *E. coli* pOLA52 (26%). pRSI13 contained 23 CDS, 16 of which encoded for proteins of unknown function and one for a putative transcriptional regulator. Other pRSI13 CDS coded for proteins putatively involved in DNA metabolism or conjugation (figure 6B). Thus, the functional annotation reveals no obvious role for this plasmid in either the ecology of the bacteria (saprophytic life in the soil) or during pathogenesis. The maintenance of this plasmid seems likely due to the TA system rather than to increased fitness.

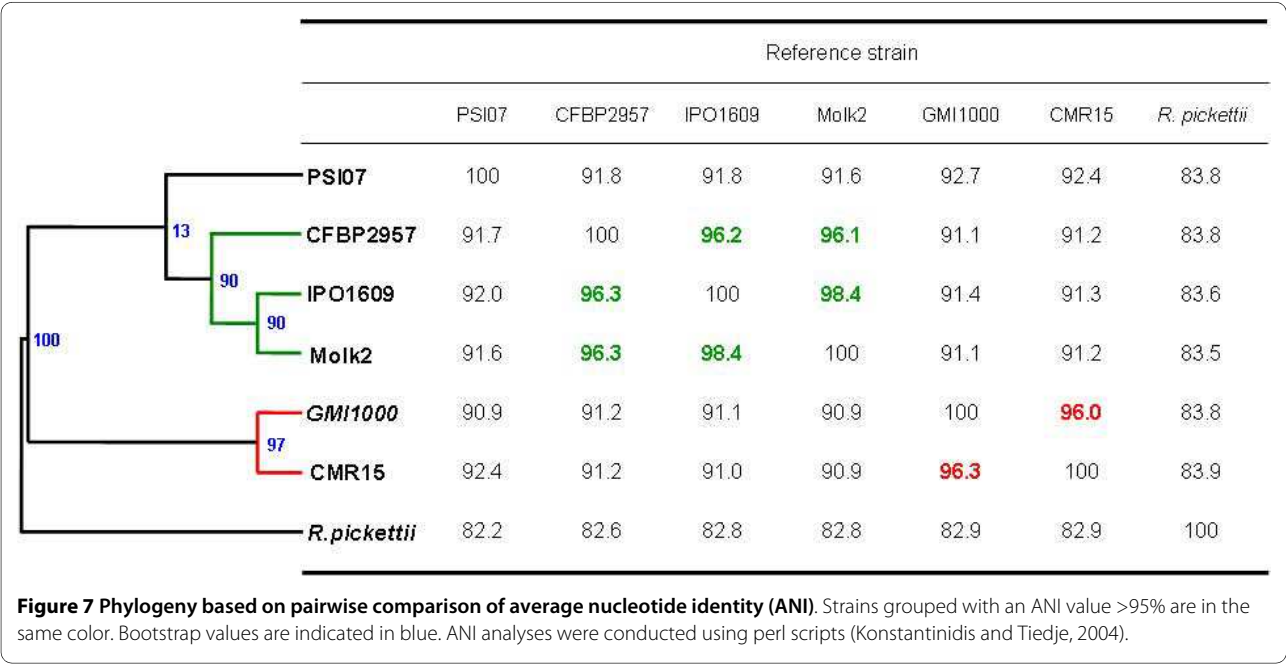
New insight into the phylogeny of the *R. solanacearum* species complex

Genomes were compared pairwise using the average nucleotide identity (ANI) calculation (figure 7); the dendrogram summarizes the results, which grouped together strains GMI1000 (Asia) and CMR15 (Africa), with ANI



values above 96%. New World (American) strains CFBP2957, Molk2 and IPO1609 (phylotype II) were likewise clustered together (above 98% ANI between Molk2 and IPO1609 and above 96% between CFBP2957 and Molk2-IPO1609). Indonesian strain PSI07 was closest to the phylotype II group, but the ANI values between PSI07 and any other strain were always less than 95%. The topology of the species complex phylogenetic tree com-

puted from ANI values was fully consistent with that observed in previous trees computed with CGH microarray data [16] and with *mutS* and *hrpB* sequences [15]. Thus, working with a smaller number of strains but with much more data per strain, these genome sequences confirm the phylotype classification scheme and their phylogenetic position, i.e. phylotype I is closest to phylotype III, and phylotype IV is closest to the phylotype IIA and



IIB. Kanstantinidis and Tiedje [51] and Goris et al. [52] demonstrated that ANI values above 95% are equivalent to the 70% DNA-DNA hybridization cut-off value traditionally used to differentiate bacterial species. Using this standard, our data identify three evolutionarily distinct groups within the *R. solanacearum* species complex: GMI1000-CMR15; CFBP2957-IPO1609-Molk2; and strain PSI07. Separate ANI analysis of replicons gave the same result as whole genome analyses (data not shown). As proposed by Stakebrandt et al [53], genomic data can be used to propose new species, provided that there is sufficient congruence with DNA-DNA reassociation.

We used CGH of a spotted microarray reflecting the pan-genome of GMI1000, IPO1609, and Molk2 to further define phylogenetic relationships among a set of 51 strains selected to span the known diversity within the species complex, and to verify that the three new genomes selected were truly representative of their respective phylotypes. Hierarchical clustering of these 51 strains (figure 8) differentiated five clusters, which each cluster matching to a phylotype (or a phylotype subdivision). This dendrogram is fully congruent with the validated phylogeny of the species complex [15,54] and deepens a previous analysis performed on a smaller set of strains with a less complete CGH microarray based only on the GMI1000 genome [16]. Furthermore, the position of each sequenced strain within its own phylotype cluster allowed us to extend ANI results to the other 46 strains. The taxonomy of the species complex can now be reviewed based on these consistent results from several

different techniques. The analyse of genetic distance between genome sequences of much strain, especially in phylotype IV, should be decisive, but our CGH data suggest that there is a solid phylogenetic basis for dividing this group into three species, according to the phylotype scheme: one species containing Phylotype II, a second containing Phylotypes I and III, and a third containing *R. solanacearum* strains from Phylotype IV.

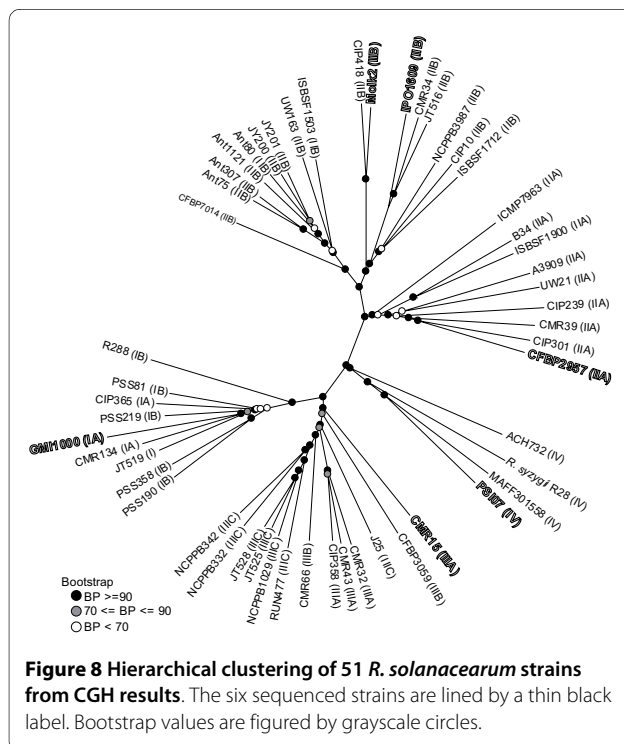
Conclusion

We compared the genome organizations and gene repertoires from six phylogenetically distant and phenotypically divergent strains from the *R. solanacearum* species complex. These strains shared many structural and genotypic traits observed in the first sequenced strain of *R. solanacearum*, GMI1000. Our results significantly expanded the known *R. solanacearum* pan-genome, identifying thousands of genes that more sharply define the common core, the dispensable and the specific (strain-unique) genomes. However, the genomes differed quite significantly. Our ANI and other analyses suggest that this large and heterogeneous species complex spans enough variation that it could be reclassified into at least three distinct taxonomic groups, which each have the equivalent of more than 30% divergence from the other two at the DNA-DNA hybridization level. Post-genomic mining of this pan-genome can combine comparative tools like CGH microarrays with phenotypic experiments to determine the distribution and the biological functions of likely traits identified with *in silico* analyses. Such combined approaches will increase our understanding of the evolutionary past, the phylogeography, and the biological specialization of *R. solanacearum* species complex strains. Although four of the six strains sequenced to date were isolated from tomato plants, our analysis did not identify any variations in previously known virulence factors that were unique to tomato pathogens. This could be explained by either 1) an insufficiently large sample of non-tomato pathogen genomes or 2) a biological unity in the core mechanisms of bacterial wilt across all *R. solanacearum* species complex members, with host specificity and ecological adaptations conferred by traits that remain to be identified. Sequencing of additional species complex members that infect highly divergent plant hosts such as clove trees and plantains will offer additional insights into the traits that confer host specificity on bacterial wilt pathogens.

Methods

Strains

The three sequenced strains were isolated from infected tomato plants (*Solanum lycopersicum*) in different geographic locations: CFBP2957 (phylotype IIA-36) was isolated in the French West Indies [Syn. MT5, [55]], CMR15



(phylotype III-29) in Cameroon [56] and PSI07 (phylotype IV-10) in Indonesia [12]. Bacteria were grown at 28°C in B liquid medium [57]. Strains CFBP2957, PSI07 (CFBP7288) and CMR15 (CFBP6941) were deposited at CFBP [58] (*Collection Française de Bactéries Phytopathogènes*, Angers, France). Table S6 [Additional file 6] provides a list of the 51 *R. solanacearum* strains used in microarray experiments, with their geographical origin and host of origin.

Sequencing and assembly

Genomic DNA was purified from overnight liquid cultures of each strain using a DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's recommendations. Sequencing of the *R. solanacearum* strains CMR15, CFBP2957 and PSI07 was performed using the strategy described by Aury et al. [59]. Around 20× coverage of 454 GSflx reads were mixed with 1× coverage Sanger reads for the scaffolding, which was derived from a 10 kb insert fragment size library. Each library was constructed after mechanical shearing of genomic DNA and cloning of generated inserts into plasmid pCNS (pSU18-derived). Plasmid DNAs were purified and end-sequenced (11520 *R. solanacearum* PIII, 14592 *R. solanacearum* PIIA and 7680 *R. solanacearum* PI) by dye-terminator chemistry with ABI3730 sequencers (Applied Biosystems, Foster City, USA) leading to an approximately 1-fold coverage. The sequences were assembled using Newbler (Roche Diagnostics) and validated via the Consed interface [60]. For the finishing phases, we used primer walking of clones and/or PCRs and transposon bombs Template Generation System™ II Kit (TGS™ II Kit) (Finnzyme), Kan3 as well as around 60× coverage using Solexa reads GAI to polish the genome draft.

Automatic and expert annotation of the *Ralstonia* genomes

Coding sequences (CDS) were predicted using AMIGene (Annotation of Microbial Genomes) software [61]. Each predicted CDS was assigned a unique identifier prefixed with "CMR15_", "CMR15_mp" and "pCMR15_", for *R. solanacearum* CMR15 (respectively the chromosome, megaplasmid, and plasmid), with "PSI07_", "PSI07_mp" and "pPSI07" for *R. solanacearum* PSI07 (respectively the chromosome, megaplasmid, and plasmid), and with "RCFBP_", "RCFBP_mp" for *R. solanacearum* CFBP2957 (respectively the chromosome and megaplasmid). The set of predicted genes were submitted to automatic functional annotation using the tools listed in Vallenet et al. [62]. Apart from the plasmid-encoded genes, the functional assignment was first based on the reference genome of *Cupriavidus taiwanensis* annotations [63] for strong orthologs i.e., 85% identity over at least 80% of the length of the smallest protein. All these data (syntactic

and functional annotations, and results of comparative analysis, see below) are stored in a relational database, called *RalstoniaScope*. Manual validation of the automatic annotation was performed using the web-based MaGe [64] (Magnifying Genomes) interface, which allows graphic visualization of the annotations enhanced by a synchronized representation of synteny groups in other genomes chosen for comparison. As described by Vallenet et al. [65] the system also offers several functions to guide accurate manual expert annotation. We performed a complete manual annotation of the CMR15 genome and then used it to automatically annotate strong orthologs in PSI07 and CFBP2957. Only 'specific' regions of these two strains, i.e. those containing genes not orthologous to ones in CMR15, were manually annotated. Finally, this expert work was used to update the annotation of GMI1000, which was published in 2002, and to automatically annotate the two other sequenced (but not finished) strains, Molk2 and IPO1609 [24]. Using the available contigs of Molk2 and IPO1909, we were not able to properly organize the corresponding sequences using GMI1000 as a reference genome. Genomes of these two *R. solanacearum* strains are thus not correctly assembled in MaGe and some analyses remain impossible with these genomes.

Complete sequence data for CFBP2957, CMR15, PSI07, GMI1000, Molk2 and IPO1609 are publicly available via the MaGe interface (*RalstoniaScope* [66]). Sequences and annotations data of *R. solanacearum* CFBP2957, CMR15 and PSI07 have also been deposited at the EMBL database [67] [EMBL:FP885897 and EMBL:FP885907 (chromosome and megaplasmid), EMBL:FP885895 and EMBL:FP885896, and EMBL:FP885906 and EMBL:FP885891 respectively. Sequences of plasmids pRSC35 and pRSI13 are available using accession numbers EMBL:FP885893 and EMBL:FP885890].

Genomic Island Identification

We used the *RGPfinder* tool in the MaGe annotation platform (Roche et al., in preparation) to investigate Regions of Genomic Plasticity (RGPs) in the whole genome sequences of *R. solanacearum* GMI1000, CMR15, PSI07, CFBP2957, Molk2 and IPO1609. RGPs are defined as regions of at least 5 kb that are missing in at least one of the genomes compared. This definition makes no assumption about the evolutionary origin or genetic basis of these variable chromosomal segments. *RGPfinder* searches for synteny breaks between a target genome and a set of closely related bacteria (generally other strains) to define RGPs. It also provides information about composition abnormalities (%G+C deviation, Codon Adaptation Index) and RGP flanking features such as tRNA, IS and repeats, which are common characteristics of genomic islands (GI). Moreover the tool integrates the results of

Alien Hunter [68] a method that analyses compositional biases to detect atypical sequences (*i.e.*, sequences potentially acquired by horizontal gene transfer).

Synteny group computation

Sequence data for comparative analyses were obtained from the NCBI database (RefSeq section [69]). Putative orthology relationships between two genomes were defined by gene pairs satisfying either the BBH criterion or an alignment threshold (at least 40% sequence identity over at least 80% of the length of the smallest protein). These relationships were subsequently used to search for synteny groups (*i.e.*, conservation of the chromosomal co-localisation between pairs of orthologous genes from different genomes) among several bacterial genomes using an algorithm based on an exact graph-theoretical approach [70]. This method allowed for multiple correspondences between genes, detection of paralogy relationships, gene fusions, and chromosomal rearrangements (inversion, insertion/deletion). The 'gap' parameter, representing the maximum number of consecutive genes that are not involved in a synteny group, was set to five.

Average nucleotide identity calculation

The average nucleotide identity (ANI) was calculated according to Konstantinidis and Tiedje [51]. Pairwise comparisons between sequences were done separately for chromosomes and megaplastids (GMI1000, CFBP2957, CMR15 and PSI07), and then for entire genomes (GMI1000, Molk2, IPO1609, CFBP2957, CMR15 and PSI07). Similarity between strains (using Euclidian distance) and dendrogram computation were conducted with the R statistical environment [71], using ape and ade4 libraries [72,73].

Metabolic network comparison

The metabolic network of each genome was predicted by the "Pathway Tools" software [74] using MetaCyc [75] as a reference pathway database (version 12.0). Starting with the functional annotation performed in MaGe, this software applies selection rules to infer possible metabolic pathways and builds a special database called a PGDB (Pathway/Genome Database). These metabolic networks for each *R. solanacearum* genome are directly available in the MaGe graphical interface. From those data, a two-dimensional matrix was built, wherein each line represents a *Ralstonia* genome, and each column a specific pathway measure (according to the Metacyc metabolic classification). Each value corresponds to a pathway completion measure (defined as the number of enzymatic reactions which have been found in a given pathway divided by the total number of reactions in this pathway in Metacyc). This data matrix is the starting point of

Principal Component Analysis, which highlights possible metabolic similarities and specificities between the genomes.

All *R. solanacearum* genomes were considered in this statistical analysis, but only pathways with non-constant completion could be analyzed. After examination of the amount of inertia captured by the method's resulting factors, 2 axes were kept for further analysis (they represent more than 67% of the total dispersion). For graphical representations, the variable (pathways) plot and the individual (genomes) plot were combined, restricting plotted variables to those with a quality of representation greater than 0.75, in order to conserve interpretability. Solely as an additional aid to interpretation and to listing readability, for each factorial plane, the pathway variables were hierarchically clustered according to the angles between their vectors. The clustering method used a Euclidean distance and ward's criterion; the number of classes was chosen after manual examination of the cluster tree, and led to 8 classes for the first factorial plane (see also Table S4-A).

CGH microarray experiments

The DNA microarray used in these experiments was generated by C. Boucher and collaborators (INRA-CNRS, Toulouse, France). This spotted microarray consists of 6,516 65-mer and 70-mer oligonucleotides representative of the genes identified from the genomes of *R. solanacearum* GMI1000 [EMBL:AL646052.1] and EMBL:AL646053.1], IPO1609 [GenBank:NW_002196569.1] and Molk2 [GenBank:NW_002196564.1]. Each gene was represented by a single oligonucleotide except for 115 effector genes, which were represented by two to six oligonucleotides to distinguish allelic forms of a given gene. A limited number of oligonucleotides representative of particular intergenic regions were also included on the microarray. This microarray also includes a set of appropriate negative controls. Each oligonucleotide was spotted twice on the microarray. DNA extraction and labelling, and microarray hybridization were performed as described by Guidot et al [16]. Standard control DNA used for all genome hybridization experiments consisted of an equimolar combination of the genomic DNA from the three sequenced strains GMI1000, IPO1609 and Molk2. Analysis was conducted as previously described using ImaGene and GeneShight (BioDiscovery) softwares [16]. A gene was considered as absent from the tested strain when the base 2 logarithm of the ratio of the normalized hybridization signal of the tested strain over the normalized hybridization signal with the control DNA was lower than the cutoff value of -1 [28].

Additional material

Additional file 1 genomes overview. Main features of CMR15, CFBP2957, PSIO7, GMI1000, MolK2 and IPO1609 genomes.

Additional file 2 new CDS GMI1000. New CDS detected in GMI1000 chromosome (sheet 1) and megaplasmide (sheet2).

Additional file 3 Genomics Islands. Genomic Island predicted in CMR15 (sheet 1 and 2), CFBP2957 (sheet 3 and 4) and PSIO7 (sheet 5 and 6) genomes.

Additional file 4 Metabolic pathways. Sheet A: class of each pathway class according to figure 6. Sheet B: Pathway completion.

Additional file 5 Virulence genes. CDS involved in virulence.

Additional file 6 strains (microarray). Strains used in CGH microarray experiments.

Abbreviations

ANI: Average Nucleotide Identity; BBH: Bidirectional Best Hit; BDB: Blood Disease Bacterium; CDS: Coding Sequence; CFBP: Collection Française de Bactéries Phytopathogènes; CFU: Colony Forming Unit; CGH: Comparative Genomic Hybridization; CWDE: Cell Wall Degrading Enzymes; EPS: Exopolysaccharides; GI: Genomic Island; GR: Genomic Region; ITS: Internal Transcribed Spacer; NRPS: Non-Ribosomal Peptide Synthase; PGDB: Pathway/Genome Database; r3b2: race3/biovar2; RGP: Region of Genomic Plasticity; TTE: Type Three Effectors; TTSS: Type Three Secretion System.

Authors' contributions

BR, AG, CA, MF, VB, CM and PP wrote the paper. AC, GS, DM, SM, VB and CM performed genomes sequencing and assembly. AG and ME performed CGH microarrays. BR, BCG, AG, GC, MW and PP carried out manual annotation. BR, CA, OP, GS, DM, CM and PP analyzed data. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank S. Genin for manuscript review prior to submission, and I. Robène-Soustrade, N. Becker, L. Gagnevin, C. Vernière and L. Costet for assistance in manual annotation. We thank also K. Konstantinidis for sharing perl scripts for ANI calculation, and X. Nesme, S. Brisse and J.P. Euzéby for helpful discussion about phylogeny and taxonomy. DNA sequencing was funded by Genoscope (grant No 133/AP2007-2008) under the authority of Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Direction des Sciences du Vivant, Institut de Génomique. This work was funded by the Fédération Nationale des Producteurs de Plantes de Pommes de Terre, Mission-DAR, Grant-7124 of the French Ministry of Food, Agriculture and Fisheries. The European Regional Development Fund (ERDF) of the European Union, Conseil Régional de La Réunion also provided financial support as part of Biorisk programme. This work was supported by the "Agence Nationale de la Recherche" ANR PFTV MicroScope and the GIS IBISA.

Author Details

¹CIRAD, UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical, Saint Pierre F-97410, La Réunion, France, ²Université de Lyon, Unité Mixte de Recherche, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne, IFR41 Bio Environnement et Santé, Université Lyon I, Villeurbanne cedex F-69622, France, ³CNRS-INRA, Laboratoire Interactions Plantes-Microorganismes, UMR2594, BP52627, Castanet-Tolosan F-31326, France, ⁴AgroParisTech, ENGREF, 19 avenue du Maine, Paris F-75732, France, ⁵University of Wisconsin-Madison, Department of Plant Pathology, 1630 Linden Drive, Madison, WI 53706, USA, ⁶Biosciences Research Division, Department of Primary Industries, 475 Mickleham Rd, Attwood, VIC, 3049, Australia, ⁷CNRS-UMR 8030, Laboratoire d'Analyse Bioinformatique en Génomique et Métabolisme, Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Direction des Sciences du Vivant, Institut de Génomique, Genoscope, 2 rue Gaston Crémieux, 91057 Evry Cedex, Evry cedex F-91006, France, ⁸Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Direction des Sciences du Vivant, Institut de Génomique, Genoscope, 2 rue Gaston Crémieux, 91057 Evry Cedex, Evry cedex F-91006, France and ⁹INRA-CIRAD, UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical, Saint Pierre F-97410, La Réunion, France

Received: 27 February 2010 Accepted: 15 June 2010

Published: 15 June 2010

References

- Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y: Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. *Microbiol Immunol* 1995, **39**:897-904.
- Hayward AC: Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J Appl Bacteriol* 1964, **27**:265-277.
- Buddenhagen I, Kelman A: Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 1964, **2**:203-230.
- Elphinstone JG: The current bacterial wilt situation: A global overview. In *Bacterial Wilt: The Disease and the Ralstonia solanacearum species complex* Edited by: Allen C, Prior P, Hayward AC. St. Paul, Mn, USA: APS Press; 2005.
- Janse JD, van den Beld HE, Elphinstone J, Simpkins S, Tjou-Tam-Sin NAA, van Vaerenbergh J: Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. *J Plant Pathol* 2004, **86**:147-155.
- Williamson L, Nakaho K, Hudelson B, Allen C: *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2 strains isolated from geranium are pathogenic on potato. *Plant Disease* 2002, **86**:987-991.
- Milling A, Meng F, Denny TP, Allen C: Interactions with Hosts at Cool Temperatures, Not Cold Tolerance, Explain the Unique Epidemiology of *Ralstonia solanacearum* Race 3 Biovar 2. *Phytopathology* 2009, **99**:1127-1134.
- Lambert CD: Agricultural Bioterrorism Protection Act of 2002: Possession, Use, and Transfer of Biological Agents and Toxins; Interim and Final Rule. *Federal Register* 2002, **67**:76907-76938.
- Vaneechoutte M, Kampfer P, De Baere T, Falsen E, Verschraegen G: *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004, **54**:317-327.
- Gillings MR, Fahy P: Genomic Fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* 1994.
- Taghavi M, Hayward C, Sly LI, Fegan M: Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* 1996, **46**:10-15.
- Fegan M, Prior P: How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? In *Bacterial Wilt: The Disease and the Ralstonia solanacearum species complex* Edited by: Allen C, Prior P, Hayward AC. St. Paul, Mn, USA: APS Press; 2005.
- Palleroni NJ, Doudoroff M: Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Bacteriology* 1971, **107**:690-696.
- Hayward AC: Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 1991, **29**:67-87.
- Prior P, Fegan M: Recent development in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. *Acta Hort* 2005, **695**:127-136.
- Guidot A, Prior P, Schoenfeld J, Carrère S, Genin S, Boucher C: Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *Journal of bacteriology* 2007, **189**:377-387.
- Eden-Green SJ, Balfas R, Sutarjo T, Jamalius : Characteristics of transmission of Sumatra disease of cloves by tube-building cercopoids, *Hindola* spp. *Plant Pathol* 1992, **41**:702-712.
- Wang JF, Hanson P, Barnes JA: Worldwide evaluation of an international set of resistance sources to bacterial wilt in tomato. In *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects* Edited by: Prior P, Allen C, Elphinstone J. Berlin: Springer-Verlag; 1998.
- Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, Gouzy J, Mangenot S, Arlat M, Billault A, Brottier P, Camus JC, Cattolico L, et al.: Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 2002, **415**:497-502.
- Genin S, Boucher C: Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol* 2004, **42**:107-134.
- Alfano JR, Collmer A: Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol* 2004, **42**:385-414.

22. Schell MA: Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annual Review of Phytopathology* 2000, **38**:263-292.
23. Poueymiro M, Genin S: Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Curr Opin Microbiol* 2009, **12**:44-52.
24. Guidot A, Elbaz M, Carrere S, Siri MI, Pianzola MJ, Prior P, Boucher C: Specific genes from the potato brown rot strains of *Ralstonia solanacearum* and their potential use for strain detection. *Phytopathology* 2009, **99**:1105-1112.
25. Gabriel DW, Allen C, Schell M, Denny TP, Greenberg JT, Duan YP, Flores-Cruz Z, Huang Q, Clifford JM, Presting G, et al.: Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Mol Plant Microbe Interact* 2006, **19**:69-79.
26. Klappenbach JA, Dunbar JM, Schmidt TM: rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**:1328-1333.
27. Medini D, Donati C, Tettelin H, Masignani V, Rappuoli R: The microbial pan-genome. *Curr Opin Genet Dev* 2005, **15**:589-594.
28. Guidot A, Coupat B, Fall S, Prior P, Bertolla F: Horizontal gene transfer between *Ralstonia solanacearum* strains detected by comparative genomic hybridization on microarrays. *ISME J* 2009, **3**:549-562.
29. Coupat B, Chaumeille-Dole F, Fall S, Prior P, Simonet P, Nesme X, Bertolla F: Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and size of DNA that can be transferred. *FEMS Microbiol Ecol* 2008, **66**:14-24.
30. Bertolla F, Frostegard A, Brito B, Nesme X, Simonet P: During infection of its host, the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* naturally develops a state of competence and exchanges genetic material. *Mol Plant Microbe Interact* 1999, **12**:467-472.
31. Nakamura Y, Itoh T, Matsuda H, Gojobori T: Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes. *Nat Genet* 2004, **36**:760-766.
32. Loper JE, Henkels MD, Shaffer BT, Valeriote FA, Gross H: Isolation and identification of rhizoxin analogs from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 by using a genomic mining strategy. *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**:3085-3093.
33. Partida-Martinez LP, Hertweck C: A gene cluster encoding rhizoxin biosynthesis in "*Burkholderia rhizoxina*", the bacterial endosymbiont of the fungus *Rhizopus microsporus*. *Chembiochem* 2007, **8**:41-45.
34. Ramette A: Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 2007, **62**:142-160.
35. Deacon J, Cooper RA: D-Galactonate utilisation by enteric bacteria. The catabolic pathway in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 1977, **77**:201-205.
36. Diorio C, Cai J, Marmor J, Shinder R, DuBow MS: An *Escherichia coli* chromosomal *ars* operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1995, **177**:2050-2056.
37. Moore LE, Pfeiffer R, Warner M, Clark M, Skibola C, Steinmou C, Alguacil J, Rothman N, Smith MT, Smith AH: Identification of biomarkers of arsenic exposure and metabolism in urine using SELDI technology. *J Biochem Mol Toxicol* 2005, **19**:176.
38. Arnold R, Brandmaier S, Kleiner F, Tischler P, Heinz E, Behrens S, Niinikoski A, Mewes HW, Horn M, Rattei T: Sequence-based prediction of type III secreted proteins. *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000376.
39. Morales VM, Sequeira L: Indigenous plasmids in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 1985, **75**:767-771.
40. Meinhardt A, Alonso JC, Strater N, Saenger W: Crystal structure of the plasmid maintenance system epsilon/zeta: functional mechanism of toxin zeta and inactivation by epsilon 2 zeta 2 complex formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**:1661-1666.
41. Ceglowski P, Boitsov A, Chai S, Alonso JC: Analysis of the stabilization system of pSM19035-derived plasmid pBT233 in *Bacillus subtilis*. *Gene* 1993, **136**:1-12.
42. Zielenkiewicz U, Ceglowski P: The toxin-antitoxin system of the streptococcal plasmid pSM19035. *J Bacteriol* 2005, **187**:6094-6105.
43. Sussman M, Mieog JC, Doyle J, Victor S, Willis BL, Bourne DG: *Vibrio* zinc-metalloprotease causes photoinactivation of coral endosymbionts and coral tissue lesions. *PLoS ONE* 2009, **4**:e4511.
44. Hase CC, Finkelstein RA: Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. *Microbiol Rev* 1993, **57**:823-837.
45. Dow JM, Davies HA, Daniels MJ: A metalloprotease from *Xanthomonas campestris* that specifically degrades proline/hydroxyproline-rich glycoproteins of the plant extracellular matrix. *Mol Plant Microbe Interact* 1998, **11**:1085-1093.
46. Eisenhut M: Investigating the role of bacterial zinc-containing metalloproteases in the pathogenesis of complicated pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med* 2008, **36**:1382-1383.
47. El Yacoubi B, Brunings AM, Yuan Q, Shankar S, Gabriel DW: In planta horizontal transfer of a major pathogenicity effector gene. *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**:1612-1621.
48. Christie PJ, Atmakuri K, Krishnamoorthy V, Jakubowski S, Cascales E: Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol* 2005, **59**:451-485.
49. Covacci A, Rappuoli R: Pertussis toxin export requires accessory genes located downstream from the pertussis toxin operon. *Mol Microbiol* 1993, **8**:429-434.
50. Vergunst AC, Schrammeijer B, den Dulk-Ras A, de Vlaam CM, Regensburg-Tuink TJ, Hooykaas PJ: VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science* 2000, **290**:979-982.
51. Konstantinidis KT, Tiedje JM: Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:2567-2572.
52. Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM: DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007, **57**:81-91.
53. Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kämpfer P, Maiden MCJ, Nesme X, Rossello-Mora R, Swings J, Trüper HG, et al.: Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002, **52**:1043-1047.
54. Poussier S, Prior P, Luisetti J, Hayward C, Fegan M: Partial sequencing of the *hrpB* and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Syst Appl Microbiol* 2000, **23**:479-486.
55. Prior P, Steva H: Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from the French West Indies. *Plant disease* 1990, **74**:13-17.
56. Mahbou Somo Toukam G, Cellier G, Wicker E, Guibaud C, Kahane R, Allen C, Prior P: Broad Diversity of *Ralstonia solanacearum* Strains in Cameroon. *Plant disease* 2009, **93**:1123-1130.
57. Boucher CA, Barberis PA, Trigalet AP, Demery DA: Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: isolation of Tn5-induced avirulent mutants. *J Gen Microbiol* 1985, **131**:2449-2457.
58. CFBP: Collection Française de Bactéries Phytopathogènes. [<http://www.intranet.angers.inra.fr/cfbp/>].
59. Aury JM, Cruaud C, Barbe V, Rogier O, Mangenot S, Samson G, Poulain J, Anthouard V, Scarpelli C, Artiguenave F, Wincker P: High quality draft sequences for prokaryotic genomes using a mix of new sequencing technologies. *BMC Genomics* 2008, **9**:603-613.
60. Gordon D, Abajian C, Green P: Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res* 1998, **8**:195-202.
61. Bocs S, Cruveiller S, Vallenet D, Nuel G, Medigue C: AMIGene: Annotation of Microbial Genes. *Nucleic Acids Res* 2003, **31**:3723-3726.
62. Vallenet D, Labarre L, Rouy Z, Barbe V, Bocs S, Cruveiller S, Lajus A, Pascal G, Scarpelli C, Medigue C: MaGe: a microbial genome annotation system supported by synteny results. *Nucleic Acids Res* 2006, **34**:53-65.
63. Amadou C, Pascal G, Mangenot S, Glew M, Bontemps C, Capela D, Carrère S, Cruveiller S, Dossat C, Lajus A, et al.: Genome sequence of the beta-rhizobium *Cupriavidus taiwanensis* and comparative genomics of rhizobia. *Genome Res* 2008, **18**:1472-1483.
64. MaGe (Genoscope) [<http://www.genoscope.cns.fr/agc/mage/>]
65. Vallenet D, Engelen S, Mornico D, Cruveiller S, Fleury L, Lajus A, Rouy Z, Roche D, Salvignol G, Scarpelli C, Medigue C: MicroScope: a platform for microbial genome annotation and comparative genomics. *Database* 2009, **2009**:bap021
66. RalstoniaScope [<http://www.genoscope.cns.fr/agc/mage/ralstoniascope/>]
67. EMBL Nucleotide Sequence Database [<http://www.ebi.ac.uk/embl/>]
68. Vernikos GS, Parkhill J: Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the *Salmonella* pathogenicity islands. *Bioinformatics* 2006, **22**:2196-2203.
69. NCBI Database, RefSeq Section [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>]
70. Boyer F, Morgat A, Labarre L, Pothier J, Viari A: Syntons, metabolons and interactions: an exact graph-theoretical approach for exploring neighbourhood between genomic and functional data. *Bioinformatics* 2005, **21**:4209-4215.

71. Ihaka R, Gentleman R: **R: a language for data analysis and graphics.** *Journal of Computational and Graphical Statistics* 1996, **5**:299-314.
72. Thioulouse J, Chessel D, Doledec S, Olivier JM: **ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software.** *Statistics and Computing* 1997, **7**:75-83.
73. Paradis E, Claude J, Strimmer K: **APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language.** *Bioinformatics* 2004, **20**:289-290.
74. Karp PD, Paley S, Romero P: **The Pathway Tools software.** *Bioinformatics* 2002, **18**:S225-232.
75. Caspi R, Foerster H, Fulcher CA, Kaipa P, Krummenacker M, Latendresse M, Paley S, Rhee SY, Shearer AG, Tissier C, et al.: **The MetaCyc Database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**:D623-D631.
76. Digat B, Escudé A: **Reconnaissance du flétrissement bactérien des Solanées aux Antilles Françaises.** *Phytiatrie et Phytopharmacie* 1967, **16**:187-197.
77. Van Elsas JD, Kastelein P, de Vries PM, Van Overbeek LS: **Effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* bv. 2 in irrigation water.** *Can J Microbiol* 2001, **47**:842-854.

doi: 10.1186/1471-2164-11-379

Cite this article as: Remenant et al., Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence *BMC Genomics* 2010, **11**:379

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Conclusions partielles

Le but de cette étude était l'analyse comparative du génome de trois souches de *R. solanacearum* : CFBP2957 (phylotype IIA-36), CMR15 (phylotype III-29), et PSI07 (phylotype IV-10) isolées respectivement en Martinique, au Cameroun et en Indonésie. Ces nouvelles souches ont été séquencées pour leurs caractéristiques phénotypiques, leur position phylogénétique distante et une meilleure couverture du complexe d'espèces. Ces données viennent compléter et renforcer les connaissances préétablies par le LIPM de l'Inra-Toulouse avec les souches GMI1000 (phylotype I-18), Molk2 (phylotype IIB-3) et IPO1609 (phylotype IIB-1). L'objectif est bien de se donner les moyens de développer l'approche postgénomique pour aborder certains des mécanismes évolutifs impliqués dans la spécialisation parasitaire dans le modèle *R. solanacearum*. Ainsi, sur un plan méthodologique, une meilleure description des différents répertoires de gènes sera associée à l'exploitation de l'ensemble de ces données dans le cadre du développement d'une puce à ADN. La construction de cet outil haut débit va permettre des analyses en génomique comparative sur de grands effectifs de souches, pour améliorer les connaissances dans le domaine de l'évolution pour cet agent pathogène.

Malgré l'inhabituelle et forte hétérogénéité qui caractérise le complexe d'espèces chez *R. solanacearum*, de nombreux gènes et fonctions relatives au pouvoir pathogène sont conservés et les seuls répertoires de gènes spécifiques que nous avons pu identifier ne peuvent expliquer les traits écologiques distincts. L'architecture du génome de *R. solanacearum* en deux réplicons est conservée dans toutes les souches et plus de 80% des gènes de ménages sont distribués sur le chromosome. Les principales caractéristiques des génomes disponibles, à savoir la taille, le taux de G+C, et le nombre de gènes, sont homogènes entre les six souches séquencées. Ainsi, on peut décrire le génome de *R. solanacearum* comme ayant une taille moyenne de 5.7 Mb (3.6 Mb pour le chromosome et 2.1 Mb pour le mégaplasme), un taux de G+C de 66.7%, pour un total de 5300 CDS prédit (3500 CDS pour le chromosome et 1800 CDS pour le mégaplasme). Un seul opéron ribosomique caractérise les souches séquencées, sauf pour CMR15 et GMI1000 qui possèdent respectivement trois et quatre de ces opérons. Les données fournies par l'analyse des séquences de ces six génomes ont permis de décrire un total de 9093 gènes caractérisant le pangénome connu de *R. solanacearum* ; il se structure en trois parties distinctes : (i) le génome core, composé des gènes orthologues conservés dans les six souches pour au moins 30% d'identité en BBH (Bidirectional Best Hit) et un recouvrement de 80% de la plus petite séquence (minLrap) ; (ii) le génome variable, composé des gènes

conservés dans au moins deux souches ; et (iii) le génome spécifique composé des gènes uniques à chacune des six souches actuellement séquencées.

En dépit des nombreux réarrangements chromosomiques, la plupart des gènes sont en synténie : plus de 70% pour le chromosome et plus de 60% pour le mégaplasmide. Les arbres phylogénétiques construits sur la base des répertoires de gènes de virulences connus présentent une topologie différente de ceux basés sur les variations de séquences de gènes comme *l'egl* ou *mutS*. Cela semble indiquer que les gènes impliqués dans la virulence évolueraient à une vitesse plus rapide que le génome considéré dans sa globalité. Néanmoins, les analyses portent ici sur six souches de *R. solanacearum* et il serait d'un grand intérêt de confirmer ces résultats sur plus de souches afin d'obtenir une résolution plus fine de la phylogénie ; les puces à ADN seraient de bons candidats pour cette étude. Ces travaux confirment l'importance des transferts horizontaux de gènes, ayant trait à des capacités biologiques encore non décrites chez *R. solanacearum* : un système de sécrétion de type IV, l'opéron « rhi » codant pour une toxine antimitotique appelée la rhizoxine, ainsi que deux plasmides de petite taille. Ces deux plasmides ont été retrouvés chez CMR15 : pRSC35 (35 kb, G+C% = 61.3) et chez PSI07 : pRSI13 (12.8 kb, G+C% = 61.0).

Sur le plan taxonomique, la comparaison des génomes par paire à l'aide de calculs basés sur l'ANI (average nucleotide identity) (Goris, Konstantinidis, *et al.*, 2007; Konstantinidis & Tiedje, 2005) révèle d'une part l'appartenance de GMI1000 (Asie, phylotype I) et CMR15 (Afrique, phylotype III) à la même espèce génomique et, d'autre part des souches d'Amérique : CFBP2957 (phylotype IIA), Molk2 (phylotype IIB), et de IPO1609 (phylotype IIB). La souche indonésienne de phylotype IV, PSI07, est proche du phylotype II, mais pas suffisamment pour être considérée comme la même espèce génomique. En complément, l'utilisation d'une puce à ADN CGH basée sur les génomes de GMI1000, Molk2, et IPO1609 révèle une forte congruence entre la phylogénie établie à partir d'un lot de 51 souches de *R. solanacearum*, avec celle basée sur *l'egl*, ainsi qu'avec les résultats ANI.

Ces données convergentes seront complétées afin de proposer la reclassification du complexe d'espèces *R. solanacearum* en trois espèces génomiques : une espèce regroupant les phylotypes I et III, une autre regroupant les phylotypes IIA et IIB, et une dernière regroupant le phylotype IV. Cette proposition sera sans doute acceptée au niveau international, suite à l'analyse de deux nouveaux génomes produit par notre groupe (Remenant et coll. en préparation) : *R. syzygii* et le Blood Disease Bacterium (BDB). Nous montrons en effet que l'ANI entre les souches séquencées du phylotype IV est au-dessus de 98% et dépasse les 99% entre PSI07 et la souche BDB, confirmant l'appartenance de ces trois souches à une même espèce génomique. Vaneechoutte *et al.* (2004) ont revu la taxonomie de *Pseudomonas syzygii* et concluent bien à l'appartenance de ces souches au genre

Ralstonia, et proposent l'espèce *R. syzygii*, pathogène du giroflier. Leurs études se basaient sur la souche type de *R. solanacearum* K60 (LMG 2299 phylotype IIA-7), soit clairement dans une espèce génomique distincte. Ainsi, il n'est pas surprenant de comprendre les raisons pour lesquelles Vaneechoutte *et al.* considèrent *R. syzygii* comme une espèce proche, mais distincte. Les conclusions de ces auteurs auraient été totalement différentes si la souche de référence de *R. solanacearum* comparée avait été un représentant du phylotype IV, par exemple la souche PSI07. Basé sur ces récentes données de génomique et de phylogénie, il sera proposé de constituer trois espèces génomiques : *R. solanacearum*, regroupant les souches de phylotype II ; *Ralstonia sequeirae* (se.que.i'ra.e. N.L. masc. gen. n. *sequeirae*, de Sequeira, nommé d'après Luis Sequeira), regroupant les phylotypes I et III dont l'espèce type serait GMI1000 ; et *R. haywardii* (hay.war'di.i. N.L. masc. gen. n. *haywardii*, de Hayward, nommé d'après Christopher Hayward), regroupant les souches de phylotype IV. De fait, compte tenu de la forte divergence phénotypique et écologique au sein de cette l'espèce génomique, nous proposons de les regrouper dans trois sous espèces : les souches de *R. solanacearum* de phylotype IV seraient renommées *R. haywardii* subspecies *solanacearum* dont PSI07 serait la souche type ; les souches de BDB seraient renommées *R. haywardii* subspecies *celebensis* ; et les souches de *R. syzygii* seraient renommées *R. haywardii* subspecies *syzygii*, en proposant les souches séquencées comme souches types.

L'analyse comparative de ces trois nouveaux génomes de *R. solanacearum* a permis l'élargissement des connaissances et complète le pangénome de cet agent pathogène. La principale conclusion est l'organisation future du complexe d'espèces en trois espèces génomiques. Notre analyse va maintenant porter sur l'approche postgénomique pour compléter les connaissances sur la phylogénie de *R. solanacearum*, associées aux questions d'évolution, relatives aux relations entre la spécialisation d'hôte et le contenu en gènes ou encore à la dynamique évolutive du génome.

CHAPITRE 5 : DYNAMIQUE EVOLUTIVE DU GENOME

CHAPITRE 5

DYNAMIQUE EVOLUTIVE DU GENOME

L'approche écologique moléculaire du complexe d'espèce *R. solanacearum* n'en est encore qu'à son commencement et même si aucun concept fort d'espèce n'est actuellement associé à cette définition (Stackebrandt, Frederiksen, *et al.*, 2002), les espèces bactériennes peuvent être perçues comme des groupes de souches unifiées par leurs fortes similitudes génomiques, tout en étant distinguables entre elles du fait des similarités entre les espèces génomiques (Grimont, 1988). À l'ère des « omics », il est désormais envisageable d'établir l'ensemble des particularités génétiques « spécifiques » des espèces au sein des génomes disponibles. Les théories évolutives suggèrent que l'existence de groupes de souches génétiquement cohérents résulte de leurs différenciations en « écotypes » adaptés à des niches différentes (Cohan, 2001). De ce fait, il y a vraisemblablement dans le génome commun aux bactéries d'une même espèce des gènes « spécifiques de l'espèce » déterminant son adaptation aux niches écologiques communes.

Les relations que *R. solanacearum* entretient avec ses hôtes sont décrites dans leurs ensembles dans la littérature, mais peu de renseignements concernent ces relations et le contenu du génome en gènes spécifiques. Les technologies d'analyse de l'ADN sont présentées généralement comme étant de plus en plus abordables, les techniques de séquençage en routine deviennent elles même communes et l'extraction des informations clés à partir de la quantité astronomique de données produites par la génomique est sans doute le nouveau défi à relever (Alfano, 2009). Ceci dit, cette masse d'information doit contribuer à consolider la connaissance des relations entre génome/transcriptome et écologie/spéciation parasitaire par le biais de la caractérisation des voies métaboliques et des cascades de régulation. Ces régulations sont requises pour l'adaptation de *R. solanacearum* au pouvoir pathogène ou comme saprophyte dans le sol. Ainsi, l'utilisation des outils disponibles recoupant les biotechnologies, la bio-informatique, les centres de ressources biologiques... permettra de traiter les données de génomique et devront servir à éclairer les phénomènes biologiques sous-jacents. Ainsi, de nombreuses approches postgénomiques peuvent être utilisées pour l'étude de la biologie des systèmes, remplaçant par exemple la fonction d'un gène dans le contexte biologique global d'un organisme. Ce domaine de la biologie moléculaire apporte donc un caractère prédictif au fonctionnement d'un organisme par le biais de données de génomique.

Ces travaux font suite à ceux de Guidot et coll. (2007) sur la caractérisation des flux de gènes expliquant la diversité de *R. solanacearum*, par le biais des puces à ADN. Cette étude

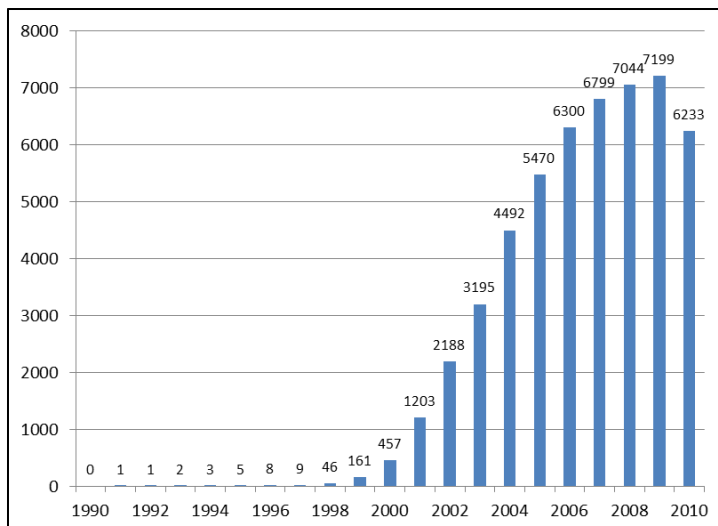


Figure 17. Nombre de publications annuelles relatives aux puces à ADN

Analyse selon la recherche de mots clefs « microarray » et « DNA chip » sous Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) avec la syntaxe suivante : « ((microarray*[Title/Abstract]) OR "DNA chip"*[Title/Abstract]) AND "X"[Publication Date] » avec « X » l'année recherchée ; [dernière mise à jour : octobre 2010].

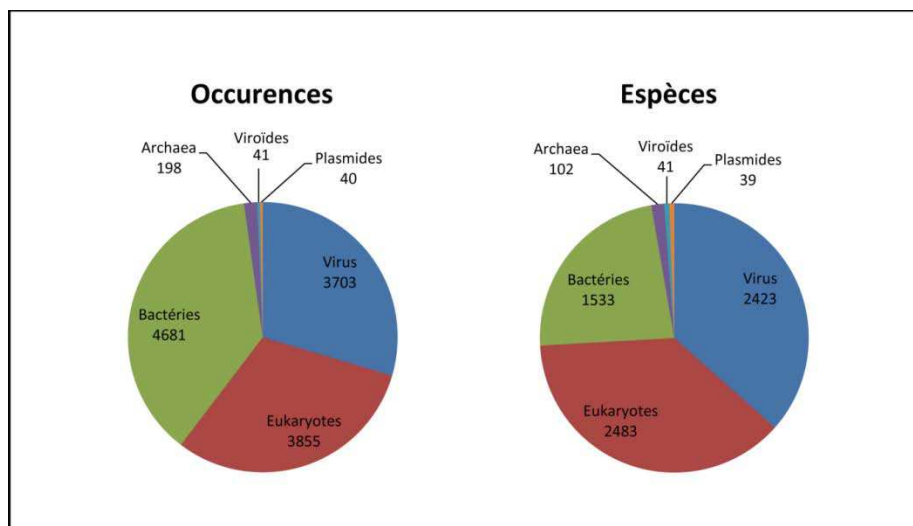


Figure 18. Nombre de génomes séquencés à ce jour

Données issues du site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/genome>) montrant le nombre total de génomes séquencés (gauche) et le nombre total d'espèces différentes séquencées (droite) ; [dernière mise à jour : octobre 2010].

pionnière a permis de mieux comprendre les concepts d'évolution de cet agent pathogène, tant au niveau de la relation entre les réplicons (chromosome et mégaplasme), que pour les mécanismes de transferts horizontaux. Cependant, cette analyse de diversité avait deux limitations : (i) le phénotype des souches étudiées n'était pas complètement caractérisé au plan du pouvoir pathogène, ce qui manquait pour conclure sur une éventuelle relation entre le contenu en gène et la pathogénie ; (ii) les analyses ont portées sur une puce à ADN dessinée avec le seul génome de la souche de phylotype I, GMI1000 ; par conséquent, il n'était pas possible d'apprécier la distribution des gènes spécifiques aux autres phylotypes. Ainsi, parmi les divers outils moléculaires en postgénomique, mes travaux de thèses ont porté sur la conception et le développement d'une puce à ADN CGH couvrant le pangénome *R. solanacearum*.

1 Les puces à ADN

Les efforts de séquençage de génome à la fin des années 80 ont ouvert de nouvelles voies en génomique, donnant des perspectives d'analyse de postgénomique qui y sont inéluctablement associées. Les premières puces à ADN datent de 1993, mais le concept fut développé dès 1987 (Bellis & Casellas, 1997). Le nombre de publications sur les puces à ADN a augmenté exponentiellement dans les années 2000, pour atteindre une moyenne de 7000 publications par an à partir de 2008 (Figure 17). Le séquençage médiatisé du génome humain commença en 1990, la majeure partie du génome a été publiée en avril 2001 (LanderLinton, *et al.*, 2001; VenterAdams, *et al.*, 2001), pour s'achever en 2006 (Levy, Sutton, *et al.*, 2007). Puis, les génomes complets de nombreux organismes ont été séquencés à ce jour, pour atteindre un effectif total de 12 518 génomes disponibles, comprenant les chromosomes, organelles et plasmides, soit 6 621 espèces différentes (données NCBI, octobre 2010, Figure 18).

Le principe des puces à ADN est issu directement des techniques de Southern blot (Southern, 1974) permettant la détection de fragments d'ADN cibles dans une mixture d'ADN, ainsi que des techniques de Northern blot (Alwine, Kemp, *et al.*, 1977) appliquées aux ARN. Ainsi, deux fragments d'acide nucléique complémentaires peuvent s'associer et se dissocier de façon réversible sous l'influence de différents paramètres physicochimiques, comprenant la température, la concentration en sel, et le pH. Le procédé se déroule en quatre temps : la conception des lames, l'hybridation, l'acquisition des données numériques et leurs interprétations. À ce jour, il existe trois types de puce à ADN dont le plus ancien, le « macroarray », est basé sur l'utilisation de membranes poreuses de nylon ne permettant de disposer que d'une faible densité de sondes. La miniaturisation du procédé a été rendue possible par l'utilisation d'un support solide en verre, de marqueurs fluorescents et par les

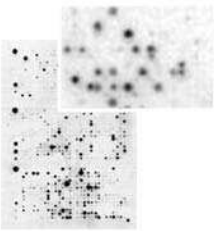
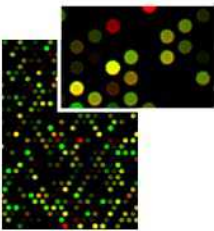
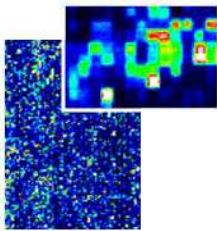
| | | | |
|----------------------------|---|--|---|
| |  |  |  |
| | Macroarray | Microarray | Affimatrix |
| Support | Nylon | Lame de verre | Lame de verre |
| Taille des spots | 0.5 - 1mm | ~ 50 µm | ~ 20 µm |
| Nombre de sondes sondes | jusqu'à 10 ⁴ Produits PCR | jusqu'à 2.10 ⁶ Produits PCR ou oligonucléotides longs (30-70 mers) | jusqu'à 2.10 ⁶ Oligonucléotides courts (20-25 mers) |
| Cibles | ADNc avec marquage radioactif au ³² P | ADN ou produits de PCR avec marquage fluorescent au Cy3 et Cy5 | ARN ou produits de PCR avec marquage fluorescent à la biotine- streptavidine |
| Application | Expression des gènes | Expression des gènes, ChIP-on-Chip, CGH | Expression des gènes, détection de marqueurs moléculaires |
| Fabricants | | Agilent Technologies, Roche NimbleGen | Affimatrix |

Figure 19. Comparaison des technologies majeures de puces à ADN

progrès de la robotique (nanotechnologies). Elle permet la fabrication de puces à très haute densité de sondes, allant jusqu'à plus de 2 millions de spots pour la dernière génération de puce. Les principales puces à ADN disponibles sur le marché sont présentées Figure 19.

Sur lames de verre, les oligonucléotides peuvent être insérés de deux façons sur le support : par greffage ou par synthèse *in situ*. Cette première technique d'insertion par greffage est aussi appelée « spottage » et a été mise au point à l'Université de Stanford (DeRisi, Iyer, *et al.*, 1997). L'ADN cible est obtenu soit par amplification PCR à partir du génome ou de banques d'ADN complémentaires (ADNc), soit par synthèse d'oligonucléotides longs (30-70 mers). Des microgouttelettes sont déposées par un robot, selon une matrice d'emplacements définis, sur une lame de verre traitée par un revêtement chimique qui permet de fixer l'ADN par une de ses extrémités ; il n'y a alors pas de restriction de longueur, mais les densités sont faibles et le procédé d'industrialisation très difficile. La technique de synthèse *in situ* se décline en deux technologies : la photolithographie (Lipshutz, Fodor, *et al.*, 1999) (« GeneChips » de la société Affymetrix ou Nimblegen), et l'impression « jet d'encre » (Hughes, Mao, *et al.*, 2001) (Agilent Technologies). Ces deux technologies ne peuvent pas être déployées dans un laboratoire indépendant et la fabrication des puces est sous-traitée dans des processus industriels. Ceci implique un coût supérieur tant au niveau de la lame qu'au niveau des équipements de laboratoire imposés par les constructeurs ; les méthodes de production restreignent la longueur des oligomères qui n'est pas possible au-delà de 70 mers. Néanmoins, le contrôle qualité est plus intense et les fabricants offrent une diversité importante dans leurs gammes de produits.

Les technologies développées durant ces dernières années ont rapidement évolué vers un choix plus large de produits, de protocoles, et d'équipement de laboratoire, qui permet une plus grande reproductibilité des expérimentations, ainsi que d'augmenter la sensibilité et la spécificité (Holloway, van Laar, *et al.*, 2002). Pour la fabrication des puces à ADN, nous avons choisi la solution proposée par Agilent Technologies qui permet d'obtenir des lames produites avec des oligonucléotides synthétisés *in situ* par impression de type « jet d'encre ». Ce choix nous permet de nous affranchir de l'étape de fabrication, du coût de l'achat massif d'oligonucléotides et de la gestion des stocks. Les plans de dépôt peuvent être gérés à la volée permettant une flexibilité et une réactivité accrue.

1.1 Applications générales des puces à ADN

Les puces à ADN sont une technologie encore récente et bien que souvent évoquées, elles touchent surtout le domaine médical dans lequel elles rentrent dans le cadre d'analyses de routine. Les applications sont diverses et touchent aussi bien aux mécanismes post transcriptionnels, qu'à l'analyse des génomes (Ye, Wang, *et al.*, 2001). Pour illustrer ce qu'il est possible de réaliser grâce aux puces à ADN, voici une liste non exhaustive des axes de recherche des différentes plateformes opérationnelles à ce jour : étude des facteurs de virulence, des interactions hôte-pathogène, de l'effet des pressions environnementales (stress, pression immune, pression médicamenteuse) sur l'agent pathogène, comparaison de transcriptomes inter-espèces, ou encore identification des cibles de régulateurs (virulence, motilité...). Ainsi, des techniques ont été développées pour comprendre ces phénomènes biologiques :

L'expression des gènes. L'analyse des profils d'expression des gènes ouvre une approche sur l'exploration des fonctions cellulaires et l'identification des gènes candidats pour un trait donné. L'analyse du transcriptome, c'est-à-dire l'expression des gènes par l'analyse quantitative ou qualitative de la production d'ARNm d'un organisme, permet ainsi de comparer des profils d'expression quantitatifs d'un organisme dans diverses conditions expérimentales ou entre divers organismes.

Les hybridations de génomiques comparatives sur puce à ADN (aCGH). L'hybridation génomique comparative (Comparative Genomic Hybridization ou CGH) a été premièrement développée comme méthode de comparaison entre un échantillon de référence et des échantillons tests. Les méthodes traditionnelles bas débits de CGH ont permis des analyses préliminaires sur les variations chromosomiques, mais restaient imprécises. Les hybridations de génomiques comparatives sur puce à ADN (Array Comparative Genomic Hybridization ou aCGH) permettent d'analyser la structure d'un génome et d'établir une carte des changements chromosomiques avec une précision supérieure, et d'établir des profils comparatifs poussés entre échantillons.

Le développement de méthodes d'analyse et de séquençage des segments courts d'ADN conduit à la découverte des short tandem repeats (Edwards, Civitello, *et al.*, 1991) et des polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) (Mir & Southern, 2000; Taillon-Miller, Gu, *et al.*, 1998; Wang, Fan, *et al.*, 1998). Il est ainsi devenu clair que les variations génétiques allaient de quelques paires de bases au niveau de la séquence, jusqu'aux différences chromosomiques larges détectables par microscopie.

Les variants de nombres de copies (CNV) est un segment d'ADN dans lequel les différences du nombre de copies ont été trouvées par la comparaison de deux ou de plusieurs génomes. La taille du secteur peut varier de 1 kb à plusieurs milliers de bases en taille. Ils sont maintenant reconnus comme une forme répandue de variation structurelle du génome contribuant à la variabilité génétique. Récemment, des études ont montré que les CNV sont associés à la fois et les maladies humaines communes et complexes : maladie de Charcot-Marie-Tooth (Lupski, de Oca-Luna, *et al.*, 1991), susceptibilité au VIH (Gonzalez, Kulkarni, *et al.*, 2005), lupus avec glomérulonéphrite (Aitman, Dong, *et al.*, 2006), et maladie de Crohn (Fellermann, Stange, *et al.*, 2006). La technique de détection est basée sur l'aCGH.

ChIP-on-chip. Les techniques traditionnelles d'analyse de l'expression des gènes fournissent de précieuses informations pour déchiffrer les génomes. La caractérisation de la complexité de la régulation de la transcription nécessite de traiter les interactions et les associations protéines-ADN, associant ainsi les domaines de la génomique et la protéomique. La technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) sur une puce contenant des régions intergéniques (chip) permet d'effectuer l'analyse de génome pour la recherche des sites de liaison et des régions promotrices, permettant d'apprécier les éléments fonctionnels des réseaux régulateurs des gènes.

La méthylation de l'ADN. Les événements méthylation de l'ADN sont des modifications héréditaires qui régulent l'expression des gènes sans modifier la séquence d'ADN. Ils sont impliqués dans les mécanismes épigénétiques de régulation pour un large éventail de processus biologiques. D'autres mécanismes similaires peuvent être analysés de la même façon que la méthylation de l'ADN, comme l'acétylation et la phosphorylation (Pollack & Iyer, 2002).

microRNA. Les microARN (miARN) sont de petits ARN non codants qui régulent l'activité de certains ARNm cibles et jouent un rôle crucial dans une grande variété de processus biologiques, comme l'expression des gènes, le développement, la prolifération, la différenciation, et l'apoptose. Les signatures d'expression des miARN sont une nouvelle classe de biomarqueurs moléculaires (Sioud & Cekaite, 2010).

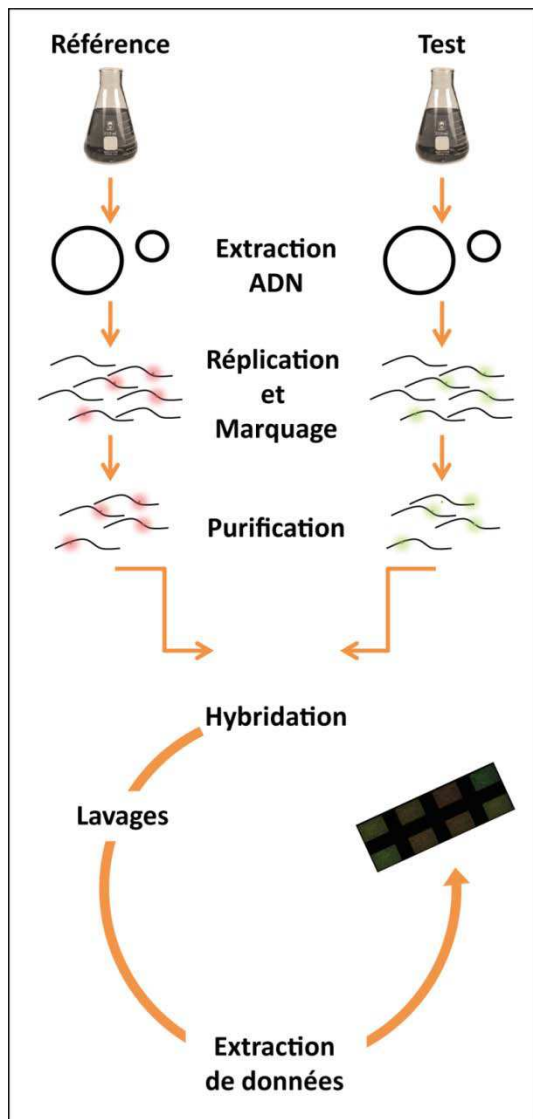


Figure 20. Flux de travail employé pour une puce à ADN CGH bicouleur

Exemple de flux de travail pour une puce à ADN de type CGH (comparative genomic hybridization).

1.2 Application à l'aCGH

Le principe de l'aCGH est de comparer deux échantillons d'ADN dont l'un sera considéré comme l'échantillon « test » et l'autre comme la « référence » (Figure 20).

L'ADN total des cellules est extrait pour être amplifié à l'aide d'une polymérase : la Klenow fragment, protéine enzymatique obtenue à partir du clivage de la polymérase I d'*Escherichia coli* par la protéase subtilisine. Cette réplication est réalisée à l'aide de « random primers », primers universels s'hybridant au hasard sur la molécule d'ADN, ainsi que de dCTP marqués à la cyanine. La cyanine est une famille de marqueurs artificiels qui trouve utilisation dans la technologie de marquage des puces à ADN notamment par le biais des molécules de cyanine 3 (Cy3) et cyanine 5 (Cy5), marqueurs fluorescents réactifs et solubles dans l'eau. Ces deux molécules permettent d'hybrider sur une même lame l'ADN dit « Test » de l'ADN dit « Référence » en le marquant différemment. Pour le Cy3, le pic d'absorbance est maximal à 550 nm et l'émission est à 570 nm, conférant une couleur verte au signal. Pour le Cy5, le pic d'absorbance est maximal est à 649 nm et l'émission est à 670 nm, conférant une couleur rouge au signal. L'hybridation implique le mélange des deux ADN marqués aux Cy3 et Cy5 sur la puce à ADN et se déroule ensuite sur 15 h durant lesquelles les fragments marqués vont s'hybrider aux oligonucléotides synthétisés sur la puce à ADN. Des lavages successifs vont permettre d'éliminer les cibles non hybridées et d'affiner le signal interprété par le scanner lors de l'extraction des données. L'intensité du signal est calculée pour chaque oligonucléotide et renseigne sur la présence ou l'absence de la cible pour laquelle l'oligonucléotide a été dessiné.

1.3 Application au diagnostic

Les puces à ADN dédiées au diagnostic peuvent être conçues pour permettre l'identification d'un organisme cible, allant jusqu'à son génotypage, et évaluer la variabilité génétique. Dans le cadre d'une mise au point d'une puce à ADN pour le diagnostic de l'organisme de quarantaine *R. solanacearum*, j'ai orienté mes travaux vers l'identification de(s) l'agent(s) pathogène(s), les positions phylogénétiques prédites et l'appartenance à un groupe phénotypique à risque (listé organisme de quarantaine, émergent...). Il est évident que le dispositif doit permettre d'accéder aussi à l'écotype auquel la ou les souches appartiennent et de renseigner sur le spectre d'hôte et sur la virulence. Le principe de fonctionnement des puces à ADN de diagnostic est identique à celui des puces à ADN CGH ; seul le design des sondes est différent, car elles sont dessinées à couvrir l'ensemble de la séquence nucléotidique des gènes cibles spécifiques. Il n'est pas question ici de sonder le pangénome, mais d'orienter vers l'analyse de groupes de sondes discriminantes dans un test de diagnostic. Cet outil permet une analyse haut débit sur plusieurs groupes bactériens en

même temps et de ce fait, augmente la rentabilité des examens et la mise en quarantaine durant une longue période n'est plus nécessaire. Pour les *Solanaceae*, plusieurs puces ont été mises au point pour le diagnostic de virus (Agindotan & Perry, 2007) ou encore comportant des multiples bactéries pathogènes (Aittamaa, Somervuo, *et al.*, 2008).

1.4 Les paramètres de l'hybridation

Outre la complémentarité entre deux molécules d'ADN, leur hybridation requiert des paramètres physico-chimiques bien précis pour obtenir une stabilité suffisante du complexe formé. De nombreuses études portent sur la stabilité de ce complexe en solution, mais le cas des puces à ADN est différent puisque les oligonucléotides sont fixés sur un support de verre. Cependant, il a été montré que les paramètres de stabilité des complexes en solutions sont corrélés avec ceux sur puces à ADN (Fotin, Drobyshchev, *et al.*, 1998; Kunitsyn, Kochetkova, *et al.*, 1996) et permettent ainsi de prédire le comportement des complexes (Maskos & Southern, 1992; Vasiliskov, Prokopenko, *et al.*, 2001). La qualité de l'hybridation est dépendante de la qualité du design des sondes. Celles-ci doivent être spécifiques, homogènes dans leurs caractéristiques thermodynamiques et doivent éviter les conformations (structures) secondaires stables sur elles-mêmes.

La spécificité des sondes est une partie critique du design d'une puce afin de produire une sonde qui ciblera une région précise du génome. Quelles soient spécifiques d'un gène, des orthologues de ce gène, d'une région inter génique ou autre, les sondes doivent être conçues pour éviter dans la mesure du possible les phénomènes d'hybridation aspécifique. Elles doivent aussi présenter une identité d'au moins 70% avec leurs cibles, quelle que soit la longueur de la sonde (Hughes, Mao, *et al.*, 2001). Une sonde conçue comme courte sera plus spécifique au niveau de l'ADN qu'une sonde conçue comme longue.

Le rendement des sondes est un autre critère qui se définit par le ratio entre le nombre de sondes répondant spécifiquement sur le nombre de sondes totales ; il caractérise la qualité d'un design. Les sondes doivent posséder le même profil thermodynamique dépendant des caractéristiques des acides nucléiques : le taux de G+C est lié positivement à l'élévation de la température de fusion (T_m), et l'énergie libre, l'enthalpie, et l'entropie sont liées au complexe formé par l'association sonde-cible (Doktycz, Morris, *et al.*, 1995; SantaLucia, 1998). Le T_m de la sonde correspond à la température à laquelle la moitié des acides nucléiques est sous forme double brin et conditionne la température de la réaction d'hybridation (SantaLucia, Allawi, *et al.*, 1996). La température de réaction doit être abaissée de 5 à 10°C par rapport au T_m (Rychlik & Rhoads, 1989). Néanmoins, cette valeur est calculée pour un ADN en solution et du fait de la fixation de la sonde sur la lame en verre, il faudra abaisser cette température de 7 à 8°C supplémentaires par rapport au T_m (Wallace,

Shaffer, *et al.*, 1979). Il est par ailleurs démontré que le marquage de l'ADN cible ne modifie pas les caractéristiques thermodynamiques (Griffin & Smith, 1998). Le T_m est influencé par deux paramètres majeurs externes au design de la sonde, que sont la concentration en acide nucléique et la concentration en sels, qui sont, comme le taux de G+C, positivement liés à l'élévation du T_m . Un autre paramètre concerne la formation de structures secondaires stables sur la sonde elle-même : ces formations en épingle à cheveux nuisent à l'hybridation avec la cible, et donc au rendement, et sont dépendantes de leurs énergies libres de formation ; plus cette énergie libre est petite, plus la probabilité d'observer une formation secondaire est grande (Southern, Mir, *et al.*, 1999). La stabilité du complexe sonde-cible influe positivement sur le rendement de l'hybridation et est basée sur quatre caractéristiques principales : (i) la complémentarité des séquences ; (ii) la composition des pentamères à l'extrémité libre des sondes doit être majoritairement des guanines ou des cytosines (Mitsuhashi, 1996) ; (iii) la nature des bases situées aux extrémités de la sonde qui doit être des guanines ou des cytosines (Southern, Mir, *et al.*, 1999; Xia, SantaLucia, *et al.*, 1998) du fait du phénomène de « fermeture éclair » (zippering process) (Maskos & Southern, 1993) qui débute sur la base à l'extrémité libre de la sonde pour finir sur l'extrémité solidaire de la lame, et limite aussi les risques de dénaturation (Williams, Case-Green, *et al.*, 1994) ; et (iv) la présence de séquence contenant trois guanines ou trois cytosines successives qui, lorsque cette condition n'est pas vérifiée, induit une erreur dans le calcul des énergies d'interaction par rapport aux valeurs expérimentales (SantaLucia, Allawi, *et al.*, 1996; Williams, Case-Green, *et al.*, 1994)..

1.5 L'analyse des images

À l'issue de l'hybridation des échantillons marqués sur la puce à ADN, des lavages successifs plus ou moins stringents sont réalisés pour éliminer au maximum les ADN non hybridés ou partiellement hybridés. La numérisation de la lame va alors permettre de fournir une image précise qui va être analysée pour en extraire des données quantitatives. Dans le cas d'un double marquage, cette phase permet de quantifier de façon relative le niveau d'intensité de chaque couleur. La qualité de cette étape est cruciale puisqu'elle va jouer sur les interprétations biologiques des données et se déroule sur quatre phases : la localisation des spots, leurs segmentations pour l'identification des zones précises à quantifier, l'extraction des données et enfin leur traitement.

La localisation des spots se fait par une grille numérique répertoriant les coordonnées de chaque spot. Cette grille est fournie par le fabricant et est issue du plan de dépôt. La localisation des spots requiert plusieurs paramètres, comme l'espace entre les spots, l'espace entre les blocs d'une puce... La précision est de rigueur, car les analyses ultérieures

dépendent de cette étape. La segmentation des spots permet un classement des pixels pour différencier les classes « signal » (foreground) et « bruit de fond » (background). Ainsi, l'image est analysée spot par spot et nécessite un découpage en plusieurs zones qui serviront à l'extraction numérique : spot à quantifier, background immédiat, background général... L'analyse doit s'adapter à des variations de la taille des spots, des formes complexes, et des irrégularités et fournir des données au cas par cas. L'extraction des valeurs se fait une fois que les deux classes de pixels sont identifiées et consiste en une mesure quantitative de paramètres clefs, appelés indices, sur la lame et permet de quantifier le niveau d'intensité de fluorescence en rouge et vert de chaque classe de pixel. De nombreuses données brutes sont produites et caractérisent chaque spot. La dernière étape est le traitement de ces données brutes par leurs normalisations afin d'obtenir des résultats comparables et homogènes entre les hybridations. Appliquée sur les données brutes, la normalisation de ces données par des traitements statistiques donnera une représentation permettant leur interprétation et autorise ainsi la vérification d'hypothèses biologiques.

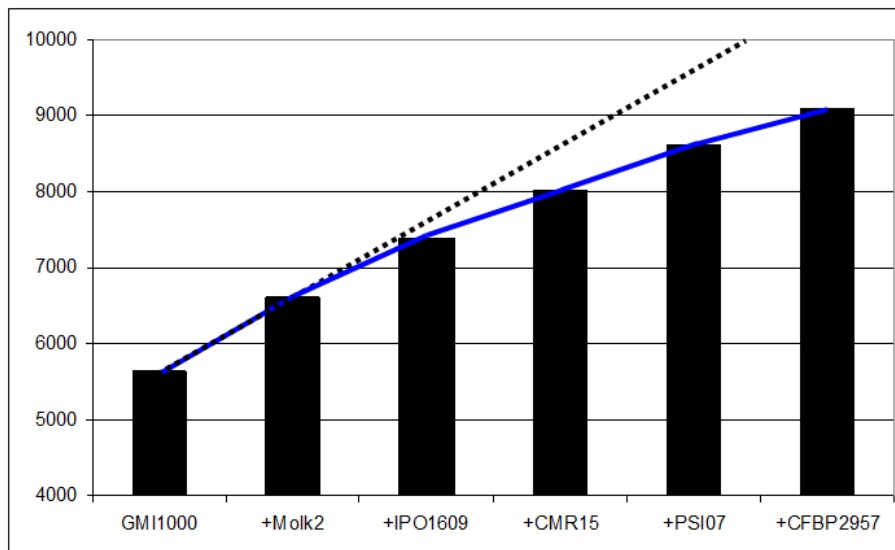


Figure 21. Courbe de raréfaction pour le séquençage des souches de *Ralstonia solanacearum*

Pour chaque nouveau séquençage, le nombre de gènes supplémentaires découvert est reporté sur le graphique, permettant de voir une progression vers une asymptote horizontale.

2 La puce pangénomique

Les travaux de génomique comparative ont révélé ces dernières années des degrés de diversité intra espèce jusqu'alors inaccessible par les outils phénotypiques traditionnels (Pallen & Wren, 2007). Les avancées moléculaires permettent désormais de travailler à « génome ouvert » et la facilité relative avec laquelle il est possible d'obtenir des séquences de génomes complets (non refermés et constitués par un très grand nombre de contigs tout de même) offre de nouvelles perspectives de recherche et autorise des questionnements scientifiques impossibles dans le passé. Ainsi pour une espèce donnée, il apparaît stratégique de déterminer combien de génomes il resterait à séquencer afin d'obtenir le répertoire le plus complet de gènes pour rendre compte précisément de la diversité génétique au sein de l'espèce étudiée. Cependant, l'expérience montre que la description de nouveaux gènes est une donnée inéluctable au séquençage de nouveaux génomes (Tettelin, Masignani, *et al.*, 2005). En théorie, il apparaît donc impossible de décrire la totalité du génome qui caractérise une espèce bactérienne particulière. C'est pourquoi la plus fidèle approximation pour décrire l'espèce se base aujourd'hui sur la caractérisation du pangénome (Medini, Donati, *et al.*, 2005). La démarche que nous avons adoptée pour choisir les nouvelles souches *R. solanacearum* à séquencer est basée sur l'évaluation du nombre de gènes nouvellement décrits pour chaque nouveau séquençage (Figure 21). Cette stratégie a été utilisée dans la littérature pour évaluer ce besoin de séquençage (Hogg, Hu, *et al.*, 2007; Tettelin, Masignani, *et al.*, 2005). Dans ces deux cas d'études ainsi que dans le nôtre, il a été décrit un répertoire de gènes commun à l'espèce, encodant potentiellement les éléments nécessaires à la survie de l'individu et aux traits phénotypiques communs. Ainsi le pangénome associe le répertoire de gènes commun à l'espèce (Génome core) et les répertoires de gènes décrits comme accessoire (Génome variable ou accessoire). Le génome accessoire est moteur de diversité de l'espèce et ces gènes codent pour des fonctions qui ne sont probablement pas indispensables à la survie de l'individu. En revanche, le génome accessoire contribue à procurer les avantages sélectifs, comme la résistance antibiotique, la possibilité de coloniser la plante hôte ou encore l'adaptation à une niche écologique (Tettelin, Riley, *et al.*, 2008).

Malgré les avancées importantes des connaissances que peuvent apporter les efforts à décrire de manière exhaustive le pangénome, il faut constater que seuls 10% des génomes bactériens séquencés appartiennent à la même espèce (Lioliou, Chen, *et al.*, 2010) et l'espèce bactérienne *R. solanacearum* fait partie des 16% des bactéries phytopathogènes à avoir été séquencées au moins deux fois. Suite au séquençage de deux nouvelles souches dans le complexe d'espèces *R. solanacearum* : *R. syzygii* et l'agent du BDB, ce complexe d'espèces se positionne second des bactéries phytopathogènes les plus séquencées au

monde, juste après *P. syringae*. Nous anticipons que la caractérisation complète de ce pangénome sera difficile pour *R. solanacearum*, car cet organisme évolue rapidement à la faveur de multiples mécanismes permettant notamment d'acquérir du matériel génétique exogène, de coloniser de multiples niches écologiques, et se déployer sur une gamme d'hôtes large et inhabituelle. Néanmoins, le core génome de *R. solanacearum* n'évoluera que très peu relativement au fait que les souches séquencées sont réparties dans l'arbre phylogénétique. Aussi, ce pangénome peut être caractérisé comme ouvert (Medini, Donati, *et al.*, 2005; Tettelin, Masignani, *et al.*, 2005), montrant un réel caractère d'espèce pour *R. solanacearum* (Tettelin, Masignani, *et al.*, 2005).

Par souci d'homogénéité dans la présentation de ma thèse, l'ensemble des données expérimentales et concepts concernant la génomique évolutive du génome chez *R. solanacearum* est présenté dans un format de publication.

Genome Dynamics, Evolution and Phylogeny of *Ralstonia solanacearum* Phylotype II

G. Cellier^{ab}, B. Remenant^{ac}, P. Lefeuvre^a, F. Chiroleu^a, and P. Prior^{ac}

^aCIRAD UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical, CIRAD-Université de la Réunion, Pôle de Protection des Plantes, 7, chemin de l'Irat, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France;

^bAgroParisTech, ENGREF, 19 avenue du Maine, Paris F-75732, France; ^cINRA, Département Santé des Plantes et Environnement.

Corresponding author: Philippe Prior; e-mail: philippe.prior@cirad.fr

Keywords: *Ralstonia solanacearum*, bacterial wilt, pangenomic CGH microarray

Abstract

Certain bacteria can cause severe damages on hosts and evolved as a highly profiled pathogen. *Ralstonia solanacearum* is known as an ancestral plant pathogen on a wide range of hosts, where ecotypes Brown rot in phylotype IIB-1 and Moko in phylotypes IIA-6, IIB-3, and IIB-4 are sadly famous for their worldwide epidemic situation. To access the evolution history and to characterize those ecotypes, we analyzed 72 *R. solanacearum* strains, mainly from phylotype IIB, on a pangenomic microarray designed from six representative and fully sequenced strains. From hybridization responses, strains phylogeny was reconstructed using both hierarchical and Bayesian clustering. Clustering analyses revealed a phylogeographic structure for phylotype IIB strains, with an Andean and an African origin for European strains. Moreover, based on the inferred tree, it was possible to reconstruct ancestral events of genes acquisition and loss. We found significantly more gain of genes targeting the chromosome than on the megaplasmid and conversely, more genes loss on the megaplasmid. Ancestral state reconstruction demonstrated high gain of mobile elements among the phylogeny and also the importance of pathogenicity and environmental adaptation related genes in the evolution of *R. solanacearum*. These findings improve our understanding of evolutionary forces driving this plant pathogen to be so successful.

Introduction

Facing the microbial communities, plants represent ecological niches that provide a wide range of nutrients for bacteria. While a large number of bacterial taxa can develop around or on plant tissue, only a few of them developed the ability to enter and multiply within plant tissue itself (Alfano & Collmer, 1996). Analyses of adaptation of these specialized organisms towards plants demonstrated the “arms race” between parasite and hosts (van Valen, 1973). This race occurred by selective pressure that lead to acquire new genes to enhance their adaptation or virulence, or by losing or modifying genes that have become elicitors of host defense mechanisms (Alfano & Collmer, 1996; Dangl, 1994). Hence, investigation of the evolutionary past of pathogenic plant-associated bacteria provides new insights on the relationships between genomics and hosts specialization.

R. solanacearum (Smith) Yabuuchi *et al.* (1995), a highly destructive and widespread bacterial

plant pathogens, is surely one of the most successful vascular bacteria. This soil borne and xylem inhabitant encompassed thousands of different strains distributed worldwide and causing bacterial wilt disease on more than 50 botanical families (Hayward, 1994). Moreover, being both a highly genetically and phenotypically heterogeneous plant pathogen species, *R. solanacearum* is an excellent case study to understand mechanisms of genome evolution in general and plant adaptation in particular. While genome structure, genes content, and distribution of this plant pathogen have been well studied these last years (Coenye & Vandamme, 2003; Genin & Boucher, 2004; Guidot, Prior, *et al.*, 2007; Remenant, Coupat-Goutaland, *et al.*, 2010; Salanoubat, Genin, *et al.*, 2002), providing a better understanding of the molecular processes ensuring *R. solanacearum* specialization (see Genin, 2010 for review), their relationships with phylogeny are still largely unexplored. The latest phylogenetic classification scheme based on molecular tools clearly confirmed that *R. solanacearum* strains are

unified into four distinct phylotypes relating to geographical origin of the strains (Fegan & Prior, 2005; Villa, Tsuchiya, *et al.*, 2005). Hence, this phylotype classification accounts for phylogeography and evolutionary past of strains, which are distributed in Asian phylotype I, American phylotype II, African phylotype III, and Indonesian phylotype IV, which host the closely related species *R. syzygii* (Sumatra disease of clove) and the banana blood disease bacterium (BDB) (Taghavi, Hayward, *et al.*, 1996; Vanechoutte, Kämpfer, *et al.*, 2004).

As a major breakthrough for *Ralstonia* evolution and comparative genomic, three *R. solanacearum* genomes were recently fully sequenced and annotated (Remenant, Coupat-Goutaland, *et al.*, 2010) in addition of four other strains (Gabriel, Allen, *et al.*, 2006; Guidot, Coupat, *et al.*, 2009; Salanoubat, Genin, *et al.*, 2002). More than confirming the previous phylotype classification, this analysis highlighted the remarkable heterogeneity of this bacteria species between phylotypes and the probable need to further reshape its classification into at least three species. There are evidences that pathogenic bacteria have mechanisms allowing a higher mutation rate on genes implicated into the interaction with hosts, in order to trigger new natural selected innovative traits and therefore, be more responsive to any environmental changes (Metzgar & Wills, 2000; Moxon, Rainey, *et al.*, 1994). Those innovations are also observed by the acquisition of foreign DNA fragments by the mean of lateral gene transfer (Eisen, 2000; Ochman, Lawrence, *et al.*, 2000), and also by the loss of gene function or genome decay (Andersson & Andersson, 1999; Wren, 2000). *R. solanacearum* is naturally competent for taking up and recombining exogenous DNA (Bertolla, Van Gijsegem, *et al.*, 1997; Coupat, Chaumeille-Dole, *et al.*, 2008), a major evolutionary force that shaped its genome structure.

In conjunction with its ability to acquire foreign DNA, a major characteristic of the genome of *R. solanacearum* is its mosaic structure in a bipartite organization, where all strains are harboring two replicons (*i.e.* units of replication): a chromosome (~3.6 Mb), the larger and more conserved replicon, and a megaplasmid (~2.1 Mb) (Genin & Boucher, 2004; Salanoubat, Genin, *et al.*, 2002). Furthermore, relationship between bacterial ecology and genome structure was formally reported (Petrov, 2001; Vinogradov, 2004), and bacteria with multi replicons usually gain adaptation to many different ecological niches with various

environmental conditions (Stouthamer & Kooijman, 1993). Combining those evolutionary abilities together, it is therefore easier to understand the success of *R. solanacearum* in extending its host range, its phenotype diversity and its geographical distribution. It is probably only with a constant and a fine tune of genome contents that such a diversity and specificity can be explained. Nevertheless accessing those data by questioning full genome content on a large strain collection remain problematic.

A former study used a CGH microarray approach to estimate genes distribution among 18 *R. solanacearum* strains shared in the 4 phylotypes (Guidot, Prior, *et al.*, 2007). This microarray was designed from the GMI1000 genome sequence (phylotype I) and encompassed about 5,000 oligonucleotides. Data from the whole genome confirmed the phylogeny in four distinct phylotypes and brought a first estimation of the core genome. However, the design of this genomic CGH microarray was restricted on one phylotype I strain, inducing a bias for estimating specific genes of the three other phylotypes. Based on this study and going one step further, we choose here to develop a pangenomic microarray from the six available sequenced genomes, distributed in the phylogeny of *R. solanacearum*. Hence, this new pangenomic tool allowed accurate exploration of genes content, distribution and further inference of gene acquisition and loss along the phylogeny (Hudson, 2008).

It is expected that the genome-scale information garnered from the pangenomic microarray will provides new insights in revisiting the evolution forces that lead *R. solanacearum* to be such a successful plant pathogen. The respective contribution part of each replicon and gene class into diversification processes between and within strains assigned to the same phylotype will be investigated. Moreover than offering a better understanding of the general evolutionary rules shaping bacterial genome in general, it also provides clues on the first events predating evolution of *R. solanacearum* into phylotypes.

We further hypothesize there is much more biodiversity to learn from genomic population that structured group of strains in phylotype II, namely cold tolerant potato Brown rot (IIB-1) and tropical Moko disease-causing strains (IIB-4), which were recognized to be monophyletic (clonal) after neutral marker approach (Cellier & Prior, 2010). We thus focus on closely related phylotype II groups of strains those shared well

characterized ecological and phenotypal traits within their clusters, in an attempt to reconstruct their evolutionary pathway along with the acquisition of their very specific phenotypes.

Materials and methods

Bacterial strains

A set of 72 unique *R. solanacearum* strains was selected according to their phylogenetic distribution among the four phylotypes and their well characterized virulence against potato (*Solanum tuberosum*), tomato (*S. lycopersicom*), eggplant (*S. melongena*), and banana (*Musa* spp.) (Cellier & Prior, 2010). A single strain of *R. pickettii* was included as out-group. Strains were obtained from different bacterial collections (Supplementary Table 1) maintained at *Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement* (CIRAD - Saint Pierre, Reunion Island; Le Lamentin, Martinique, French West Indies), *Laboratoire National de la Protection des Végétaux* (LNVP - Angers, France), *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA - Rennes, France), University of Queensland (Brisbane, Australia), and *Collection Française de Bactéries Phytopathogènes* (CFBP - Angers, France).

Probe design and microarray manufacturing

Biological probes ($n = 10,911$, see Supplementary Table 2) were designed from six sequenced and annotated genomes of *R. solanacearum*: GMI1000 (Salanoubat, Genin, *et al.*, 2002), Molk2 and IPO1609 (Guidot, Coupat, *et al.*, 2009), CMR15, CFBP2957, and PSI07 (Remenant, Coupat-Goutaland, *et al.*, 2010). These six genomic sequences are publicly available on the online MaGe interface (https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/about/collabprojects.php?P_id=67). Probe design was performed by Imaxio (Clermont-Ferrand, France) using the following strategy: two 60 mers probes were designed from every CDS (coding sequence) of each sequenced genomes. Three groups of probes were then constituted and called “specific”, “core”, and “variable”, according to their targets specificity. The group “specific” was composed of the probes only targeting a single strain out of the six fully sequenced and were then encoded “CFBP”, “CMR”, “GMI”, “IPO”, “MOLK”, or “PSI”, depending of the targeted strain. The group “core” was composed of probes targeting all orthologous genes in the six sequenced genomes, and was encoded “COR”. The group “variable” was composed of probes

targeting genes present in at least two, but not all, sequenced genomes, and were encoded “VAR”. To avoid the redundancy of probes targeting orthologous genes, probes were filtered based on their BLASTN results (Altschul, Madden, *et al.*, 1997) and best probes were selected considering a 80% minimum match, a melting temperature (T_m) of $77^{\circ}\text{C} \pm 9^{\circ}\text{C}$, and a G+C content of 57% $\pm 20\%$ (see Supplementary Figure 1 and Supplementary Table 2 for details). After filtering, the final set of probe was constituted with 3317 core, 3631 variable, and 3963 specific probes. To assess the hybridization quality and inner-slide reproducibility, 10 replicates of 300 biological probes (275 from the “core” group and 25 from the “variable” group, Supplementary Table 2) and Agilent Controls were added to the microarray. A total of 42 negative probes, which were not complementary with *R. solanacearum* genomes (7 probes of random sequences and 35 *Cupriavidus taiwanensis* sequences based probes, Supplementary Table 2) were also added. Microarrays were manufactured by Agilent Technologies (Santa Clara, CA) using *in-situ* synthesis. Oligonucleotides were randomly spotted on the slide surface.

DNA labeling and hybridization

Overnight liquid cultures were pelleted at 5400 rpm and washed with 500 ml NaCl 1 M, before genomic DNA purification using a DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations. Labeling of genomic DNA was performed according to Guidot *et al.* (2007). Labeling reactions were performed in complete obscurity at 37°C for 2h. Reactions were stopped with $5\mu\text{l}$ of 0.5 M EDTA pH 8 from Bioprime DNA Labelling system kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) and stored on ice.

Purification of labeled products was performed using CyScribe GFX purification kit (GE Healthcare, Bucks., UK), according to the manufacturer's recommendations. DNA concentration was adjusted to $70\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ in HPLC grade water using Nanodrop spectrophotometer ND-8000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, MA), for an average dye labeling concentration of $12\text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Hybridizations were performed overnight (approx. 16h) in the G2545A Agilent Technologies microarray hybridization oven, using the microarray Agilent's recommendations and reagents with the $8\times 15\text{K}$ Custom CGH microarray protocol (available on Agilent website).

Each Cy3-labeled genomic DNA was hybridized one time, except genomic DNA of the six sequenced genomes, which were hybridized three times to assess inter-slide reproducibility. Genomic DNA of CMR15 strain labeled with Cy5 was included in each hybridization as reference for further reproducibility tests.

Image scanning and data analysis

Scanning of slides was performed at a 5 µm resolution using the Agilent Technologies scanner G2565CA managed by Scan Control software 8.5 (Agilent Technologies). Data extraction from the 16-bit TIFF image was done with Feature Extraction software 10.5.1.1 (Agilent Technologies).

The free statistical R software (R Development Core Team, 2009) was used to perform data manipulation and statistical analysis. Spot intensity was calculated with the difference between the median foreground and the median background intensities, and normalized according to the standard normal deviate method, along with a base 2 logarithm. The dispersion of the mass-distribution was assessed using a kernel density method with the bandwidth of a Gaussian kernel density estimator (Sheather & Jones, 1991; Silverman, 1986), available in the R package “stats”. A threshold was estimated independently for each hybridization as the intensity value between the two peaks of the spot density distribution. This threshold allowed estimating two responses of probes based on their binary signal: 1 (i.e. gene present in the strain) and 0 (i.e. gene absent in the strain). All further analyses were performed on this binary data set.

Clustering

To assess the phylogenetic relationships of the 72 *R. solanacearum* strains, a binary distance matrix was computed. Phylogeny was then reconstructed from this distance matrix using the neighbor-joining algorithm (Saitou & Nei, 1987), available in the R package “ape” (Paradis, Claude, *et al.*, 2004), with 1,000 bootstrap replicates.

Bayesian clustering was performed with the software STRUCTURE v2.3.3 (Pritchard, Stephens, *et al.*, 2000). This iterative model-based analysis aimed to assess the population structure with assignment of individuals to “K” clusters, allowing for admixture. Analyses were set to a burning period of 50,000 iterations followed with 100,000 iterations. A total of 20 independent simulations were performed with K

ranging from 1 to 10. The appropriate number of cluster (K) was estimated following the method described by Evanno *et al.* (2005).

Gene content evolution

While the experimental design used here, a CGH microarray, doesn't allow the discovery of new genes in the pangenome of *R. solanacearum* (i.e. the analysis is limited to probes specifically designed to target known sequences), it can be used efficiently when it comes to estimate the core genome of close relative strains. Knowing the microarray design already included probes corresponding to the CDS of six full genome sequences, questioning a group of neighboring strain will effectively downsize the number of positively responding probes to the set absolutely conserved in this group.

This number of core oligonucleotide probes was computed for a growing number of strains with 100 resampling. Analysis of the data, through a so-called depletion curve, allows an estimation of the exhaustiveness of the strain sampling: the curve is expected to reach a plateau, with an optimum number of strains corresponding to the core probe set.

Based on the phylogenetic tree, we also attempted to reconstruct the ancestral state of each probe (present or absent) for every nodes. To this end, we use the likelihood method for discrete state reconstruction implemented in the “ace” function from the R package “ape” (Paradis, Claude, *et al.*, 2004). Taking branch length into account, this method computes the presence and the absence probability, ranging from 0 to 1, of probes at a given node of the phylogeny. Comparison of those probabilities between two nodes gave an estimation of the nature and number of probe loss and gain events (loss or gain), both defined with a variation superior to 0.5 of the probability of presence and absence. When focusing on the very deep branch of the tree, these data first provide a view of gene events of acquisition and loss predating the formation of each phylotypes. Also, when summarizing loss and gain values over the whole phylogeny, it is possible to estimate and compare dynamics of genes gain and loss depending on a given criterion, such as gene localization (i.e. chromosome or megaplasmid) or gene function. These values of “gene movement” were compared using a Chi-squared contingency table test.

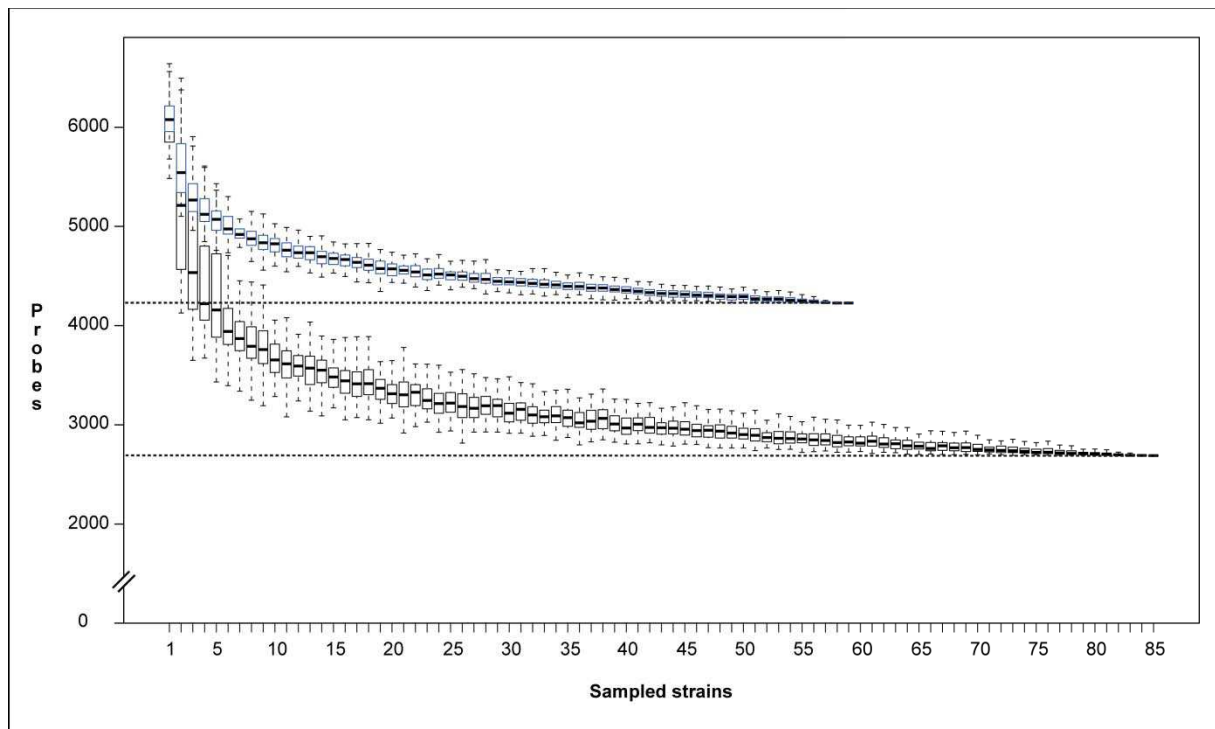


Figure 22. Depletion curves

Depletion curve of the core probe set for the phylotype IIB strains (n=59, blue whisker plots) and all the four *Ralstonia solanacearum* phylotypes (n=85, black whisker plots). Each whisker plot represents the distribution of the number of positive probes in every strains of the tested group (size given on the horizontal axis) after 100 resamplings.

Results

Microarray performance

Assessment of the experiment quality was based on the analysis of replicates probes response along with hybridization prediction through genomes sequences.

Specificity and sensibility

Specificity and sensibility of the pangenomic microarray were estimated with the comparison of the gene content of the six *R. solanacearum* full genome sequences and the gene content revealed by the pangenomic microarray. Probes designed as negative controls were always given a negative response. More than 98.1% of the genes are retrieved in the pangenomic microarray experiments and thus, 1.9% of probes responses could be considered as false negative. On those, a total of 36 probes always gave a negative signal and were removed from analysis. In addition, less than 4.8% of the positive responses were triggered by hybridization of genomic DNA to probes designed on another genome and thus constituted false positive responses. Out of 10,911 probes, 2690 probes (24.7%) always gave a positive response with the *R. solanacearum* DNA and were mainly targeted chromosomal genes (83.0%); these probes constituted the array core probes (ArCP). Further analysis focused on the minimal gene set described by Gil et al. (2004), which includes well conserved housekeeping genes for basic metabolism and macromolecular synthesis, where many of which are essential genes. Of the 205 unique genes part of the minimal gene set, 199 were found in the *R. solanacearum* sequenced genomes and were targeted by at least one probe from the ArCP group

Reproducibility

The reproducibility of the experiment was assessed using 300 replicates of probes on each array (inner-slide reproducibility), 85 replicates of strain CMR15 (III-29) labeled with Cy5 (normalization between slide and inter-slide reproducibility), and 3 replicates of each sequenced genomes (inter-slide reproducibility). Replicate probes within an array showed an average inner-slide reproducibility of 97.6%. Cross comparison of strain CMR15 Cy5-labeled hybridizations showed 93.4% of reproducibility, 96.7% of reproducibility between Cy3 and Cy5 labeled hybridizations on all replicates, and 99.6% of reproducibility on the same array.

Comparison of the three hybridization replicates of the six sequenced strains showed an average inter-slide reproducibility of 96.8% (*i.e.* same binary response), ranging from 94.3% (CMR15) to 98.6% (CFBP2957).

Depletion curves

Depletion curves (Figure 22) represents the relation between the number of strain hybridized on the pangenomic array and the number of positive probes for every of those strain. Curves were computed and plotted for all the *R. solanacearum* strains (black curve) and the phylotype IIB (blue curve). In both curves, after a massive decrease in population of positive probe responses for the first ten strains sampled, the number of positive probes tended to stabilize with the growing number of strain tested and reached a plateau at 2,690 genes and 4,228 genes for all and for the phylotype IIB strains respectively.

Phylogeny in *Ralstonia solanacearum* species complex

Hierarchical clustering

Confirmed with high bootstrap values, strains were distributed into four major clusters and subdivisions, respectively corresponding to their phylotypes and sequevars (Figure 23A). Replicates of hybridizations were clustered together. The *R. pickettii* strain clearly constituted an outlier from the *R. solanacearum* species complex and was assigned as an out-group. It is important to notice here that all the phylotypes were monophyletic on the tree. From the *R. solanacearum* common ancestor (indicated with a red star on Figure 23A), the ancestor of what is now the phylotype IV appeared to diverge early. The tree topology then showed a split between phylotype II and the ancestor phylotype I and III. In the phylotype II, a clear segregation showed by a long branch appeared between phylotypes IIA and IIB. Looking closer within phylotypes, three strains clearly constituted outliers from their sequevars, confirmed with high bootstrap values: strain CMR15 (III-29) in the phylotypes III; strain CFBP6797 (IIB-4NPB) in the phylotype IIB; and strain CFBP3858 (IIB-1) in the phylotype IIB-1. Some other strains, such as IBSBF1712 or CFBP7014, unique members of their sequevars show only a distant relationship to the other strain in their phylotypes.

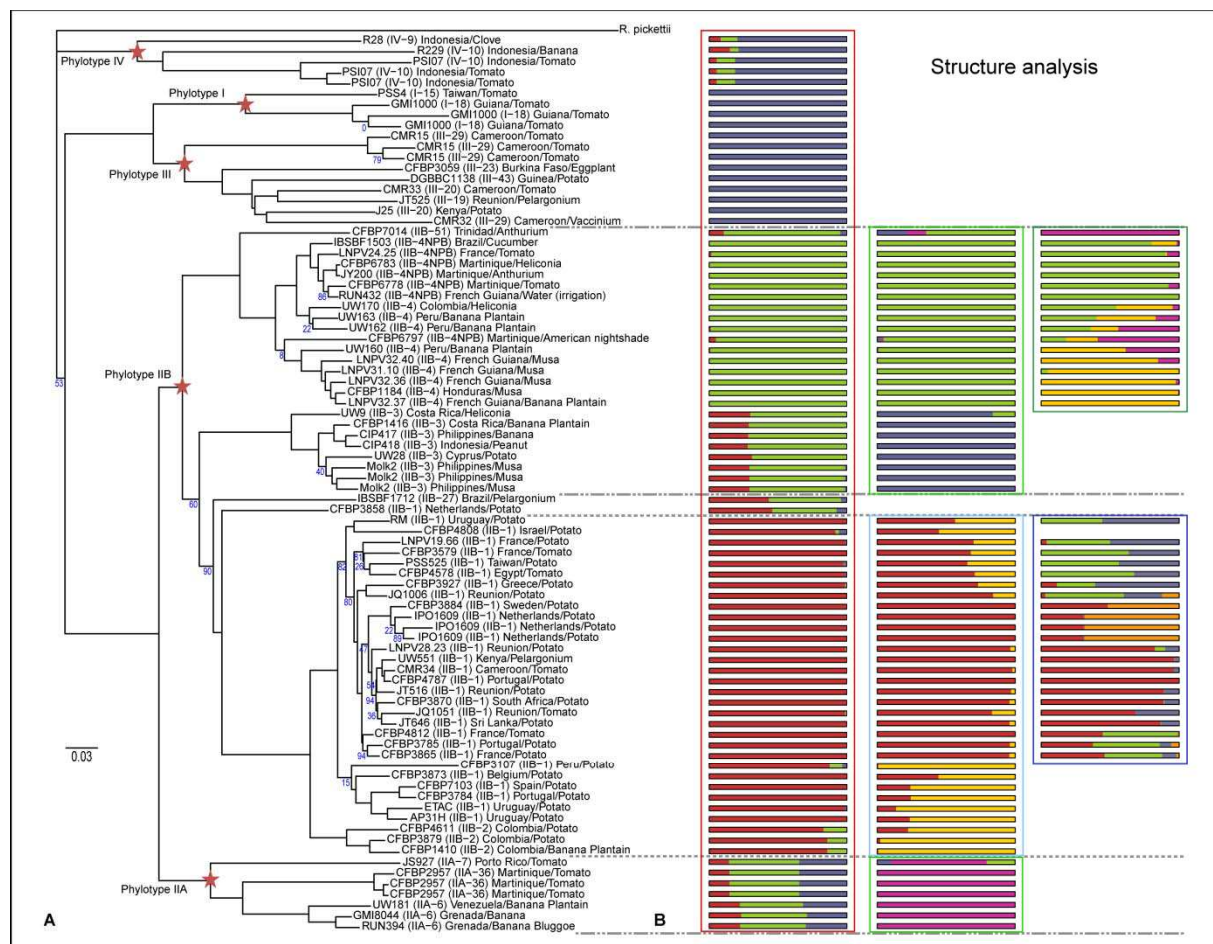


Figure 23. Phylogenetic structure of *Ralstonia solanacearum* species complex

(A) Neighbor joining phylogenetic tree of 72 *Ralstonia solanacearum* strains computed with 1,000 resamplings. Bootstrap values below 95% are represented on nodes. Strains are detailed with their phylotype and sequevar (in parenthesis), along with their country and host of isolation. (B) Clustering and source of ancestry of the strains. Each colored box represents independent analyses of all *R. solanacearum* strains (red) or ecotype with Moko causing strains (light green), phylotype IIA strains (dark green), Brown rot strains (light blue) and phylotype IIB-1 and IIB-2 together (dark blue). Within an analysis, each bar represent with different colors the proportion of ancestral nucleotides inherited from each of the inferred ancestral populations.

Bayesian clustering

Bayesian clustering performed with STRUCTURE software was used to assess the occurrence of a structure within a given population. According to the probability of the data given the number of cluster, the appropriate number of cluster in the whole *R. solanacearum* population was defined to three (Figure 23B, red box). The first cluster (red bar) was composed of all strains from phylotypes IIB-1 and IIB-2 with an average inference of cluster membership of 0.975 and a FST value of 0.870. The second cluster (green bar) was composed of all strains from phylotypes IIA, IIB-3, IIB-4, IIB-4NPB, IIB-27, and IIB-51, with an average inference of cluster membership of 0.814 and a FST value of 0.811. The third cluster (blue bar) was composed of strains from phylotypes I, III, and IV, with an average inference of cluster membership of 0.949 and a FST value of 0.290. More than statistically infer probable groups of strains, information which is in fact available with a quick examination of the tree, the STRUCTURE analysis also attempts to determine the possible admixed nature of individuals (i.e. their interbreed origin). This is translated with the assignment of an individual to more than one group (see for example on Figure 23B the red, green and blue in the IIA bars). Looking closer to the clustering, it appeared that individuals from the phylotype IV, from the IIA and IIB-6 groups present an admixed signature. Interestingly, two others sequences: CFBP3858 (IIB-1) and IBSBF1712 (IIB-27), defined as outliers when examining the tree were assigned with relatively high inference value to both the red and the green groups.

Evolution of gene content among ancestral branches

By reconstructing the ancestral state (presence or absence) of each probe along the phylogeny, it was also possible to track their acquisition and loss events. Following this approach, we attempt to (i) estimate the dynamics of movement of a given category of probes and (ii) characterize events at the origin of the diversification of each phylotypes. We choose to focus on five categories of probes relatively to their target types. Hence, genes related to pathogenesis were selected in first place. Since this bacterium is naturally competent for DNA exchange, it was of particular interest to appreciate gene movement across mobile elements. *R. solanacearum* being also adapted to a wide range of environmental conditions, genes related to environmental

adaptation were also studied. Finally, regarding gene class metabolism class was chosen to set up a comparison of stability through evolution. Our fifth and last category was genome localization, either on the chromosome or on the megaplasmid.

Dynamics of genes

After sorting the loss and gain into the different class of probes, the statistical comparison of distributions demonstrate there were significant differences between these classes with different levels of probe gains and losses (Figure 24). The “*Extrachromosomal origin*” class of genes has the highest movement values which was mainly associated with gains. On the contrary, in other classes, the main movement was due to losses. Genes assigned in the “*Pathogenesis*” class were characterized by both high losses and gains among the phylogeny and had a similar dynamics of movement compared to those assigned in the “*Environmental Adaptation*” class. The “*Metabolism*” class was showed to have the lowest movement values both in loss and gain among the phylogeny of *R. solanacearum*.

Regarding genomic localization, it appears clearly that probes targeting the megaplasmid present significantly more movement in general ($p\text{-value} = 2.92 \cdot 10^{-11}$) than probes targeting the chromosome; the same observation was done for gene losses ($p\text{-value} = 9.66 \cdot 10^{-13}$). But probes targeting the chromosome present significantly more gains than probes targeting the megaplasmid ($p\text{-value} = 1.96 \cdot 10^{-2}$).

Ancestral movement of genes

The acquisition and loss of the four previously described gene classes were summarized on the phylogeny along with their localization (the fifth class) on either the chromosome or the megaplasmid (Figure 25A). For convenience, only the branch predating the apparition of the phylotype, and so representing the evolutionary step from the most recent common ancestor of all the *R. solanacearum* ($R_{sol_{MRCA}}$) to every ancestor of each phylotype, are displayed on the tree. Regarding the branch of *R. pickettii* (data not showed), as expected because none of the probe was designed to be specific to this sequence, only high losses for every class of genes were inferred. Evolution of *R. solanacearum* strains belonging to phylotype IV was straight from the ancestor and undergone both high losses and gains for all classes on both replicons. The description of the other phylotypes ancestries implied each time the

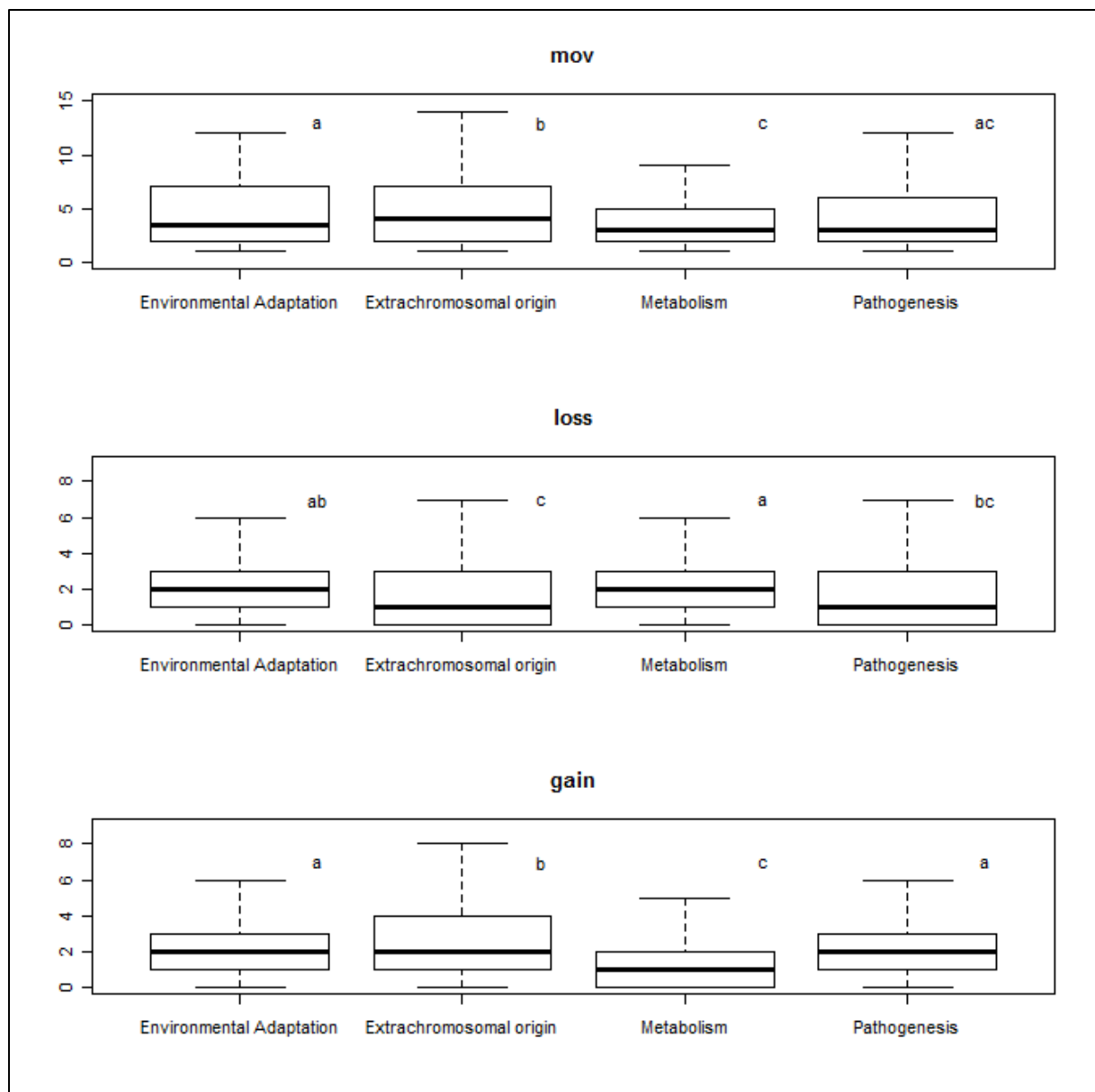


Figure 24. Genes class distribution

Representation of the distribution in boxplot of the movement (A), loss (B) and gain (C) of *Ralstonia solanacearum* genes along its phylogeny. Letters over boxed graphics are character-based statistics estimated using a Chi-squared contingency table test. Letters are assigned to the distribution from the highest to the lowest (p -value=0.05) following the alphabetical order. Classes of genes are organized in four groups: “*Environmental Adaptation*”, related to toxin production and resistance, biosynthesis of natural products, detoxification and cell adhesion; “*Extrachromosomal origin*”, related to phage, prophage, and transposon; “*Metabolism*”, related to the metabolism of amino acid, sugar, lipid, purine and pyrimidine, protein, aerobic and anaerobic, scavenge, central intermediary metabolism, phosphor, sulfur, nitrogen, and transport and binding proteins; “*Pathogenesis*”, related to effectors and pathogenicity related traits.

analysis of three other consecutive branches. On the branch separating the $R_{solMRCA}$ to the MRCA of phylotypes I, IIA, IIB, and III (branch 2 on figure 4A), only limited losses and gains are inferred, mainly on the megaplasmid. The subsequent branches, leading to the phylotype II (branch 3) or to the phylotypes I and III (branch 6), showed higher gene gains and losses on both the chromosome and the megaplasmid. Interestingly, while many genes in all the four defined classes were acquired mostly on the megaplasmid, on the branch leading to the IIA subgroup (branch 4), only a high loss of genes related to environmental adaptation was observed on the branch predating the phylotype IIB (branch 5). While a high number of gain or loss of genes are inferred on the branch 8 predating the phylotype I, only few movements were observed on the branch leading to phylotype III (branch 7).

Now focusing on the intra phylotypes gain and loss (Figure 25B), it is important to notice that the gain and loss value doesn't have the exact same meaning as when considering the ancestral events leading to phylotype. If both summary statistics are computed from the same primary value (i.e. the probabilities of presence and absence of a probe at a given node), the intra-phylotype results represent the cumulative loss and gain events occurring upon the whole set of branch forming the phylotype. In this framework, a probe will account in the summary statistics as many times as it is loss or gain in the phylotype. This second analysis is then more representative of the specific dynamics occurring inside each of the phylotypes. It is first interesting to notice that phylotypes IIB and III, for which the ancestral branch doesn't display high acquisition or loss, are the two phylotypes in which the highest number of gain were observed (3026 and 1913 probes respectively). Along with the phylotype IIA, the phylotype IIB has also the particularity to show a high dynamic of probes gain related to elements of extrachromosomal origin. Regarding the loss, it was also the group IIB and III along with the IV (2841, 1651 and 2098 probes respectively) that presented the highest numbers of events. For the phylotype III loss, importantly, gene for environmental adaptation presents a statistically higher dynamics of loss than other probes classes. Fewer events are observed in the groups I and IIA, reflecting the lower intra-group diversity (0.14 and 0.19 respectively; Π value on Figure 25B) than in the other groups (0.25, 0.27, and 0.28 for the phylotypes IIB, IV, and III respectively). As

shown above, the “metabolism” probes presented the lowest rates of movements.

Brown rot phylogeny

Hierarchical clustering

We then focus on the well-known ecological groups, such as cold-tolerant potato Brown rot strains and banana Moko disease-causing strains. Brown rot strains are distributed into the sequevars 1 and 2 (Figure 23A and Table 6), which are both monophyletic in the phylogeny. Sequevar 1 is subdivided into at least five clusters, some presenting geographical clustering, namely northern Europe (referred as “North”, two strains), Africa and Indian Ocean (referred as “AIO”, eight strains) and the Andean region (referred as “Andean”, six strains). Whereas a fourth cluster is constituted with eleven strains with heterogeneous geographical (referred as “EuMr”) origin, an outlier, CFBP3858 isolated in the Netherlands, form the fifth cluster (referred as “out”). This same phylogeny was inferred if restricting the probes to the one distributed either only on the chromosome or on the megaplasmid (data not shown).

Bayesian clustering

We then assessed the population structure on Brown rot strains from phylotypes IIB-1 and IIB-2 using a Bayesian clustering approach (Table 6 and Figure 23B, light blue box). As a first step, we analyzed the population structure of all strains clustering into the two Brown rot sequevars but we decided to discard strain CFBP3858, isolated in the Netherlands from potato, as regards its outer position towards phylotype IIB-1. Data showed a two partition Bayesian clustering, where 20 strains from phylotype IIB-1 constituted a first major cluster (red bar) and seven strains from phylotype IIB-2 along with three strains from phylotype IIB-1 constituted a second major cluster (yellow bar). As a second step, we focused our Bayesian clustering analysis only on the 20 Brown rot strains from phylotype IIB-1 that previously clustered into the first major cluster (Table 6 and Figure 23B, dark blue box). A partition into four clusters was inferred, where nine strains constituted cluster “a” (red bar), six strains constituted cluster “b” (green bar), three strains constituted cluster “c” (blue bar), and two strains constituted cluster “d” (orange bar).

Moko disease causing strains and emerging strains phylogeny

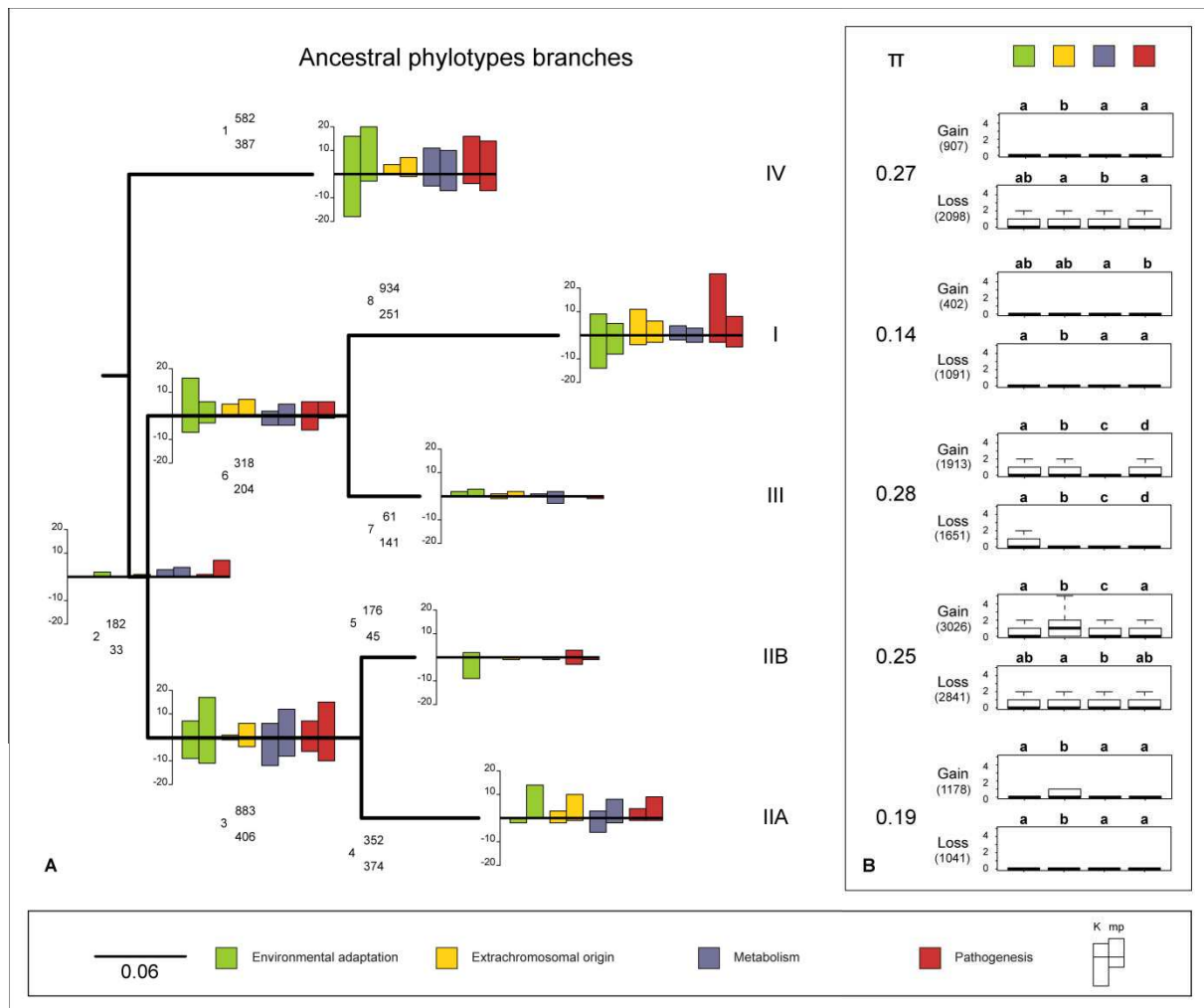


Figure 25. Ancestral reconstruction of *Ralstonia solanacearum* phylogeny

(A) Schematic representation of ancestral branches of *Ralstonia solanacearum* phylogeny based on pangenomic microarray. Graphical representation over branches represents the inferred percentage of gain (positive number) and loss (negative number) of probes signal along the branch. Results are presented for both chromosome “K” and the megaplasmid “mp” relatively to four classes linked to gene product. From the left to the right: “Environment Adaptation”, related to toxin production and resistance, biosynthesis of natural products, detoxification and cell adhesion; “Extrachromosomal origin”, related to phage, prophage, and transposon; “Metabolism”, related to the metabolism of amino acid, sugar, lipid, purine and pyrimidine, protein, aerobic and anaerobic, scavenge, central intermediary metabolism, phosphor, sulfur, nitrogen, and transport and binding proteins; and “Pathogenesis”, related to effectors and pathogenicity related traits. (B) Summary statistics of the inferred number of gain and loss of probe signal inside each phylotype. The n diversity index is given on the left while numbers in brackets correspond to total gain or loss in the considered phylotype.

Hierarchical clustering

We then considered the Moko disease causing strains phylogeny (Figure 23A). Three clusters of strains appeared, and were constituted by the phylotypes IIA, IIB-3, and IIB-4. It is important to notice that the phylotype IIB-4 didn't form a monophyletic group, where some strains were emergent and not pathogenenic to banana ("NPB" strains). All these strains were described in South America ($n = 8$), West Indies ($n = 7$), Philippines ($n = 5$), and Europe ($n = 1$).

Bayesian clustering

We assessed the population structure of the Moko disease causing strains from phylotypes IIA-6, IIB-3, IIB-4, and the newly described phylotype IIB-51, along with the emerging strains from phylotype IIB-4NPB (Table 7 and Figure 23B). As a first step, we analyzed the population structure of all strains clustering into the three Moko sequevars and sequevars 4NPB, 7, and 36 (Table 7 and Figure 23B, light green box). Three clusters were inferred from the analysis, where strains from phylotype IIB-3 constituted a first major cluster (blue bar), strains from phylotypes IIA-6, IIA-7, and IIA-36 constituted a second major cluster (purple bar), and strains from phylotype IIB-4 along with strains from phylotype IIB-4NPB constituted a third major cluster (green bar). As a second step, we focused our Bayesian clustering analysis only on the third major cluster (Table 2 and Figure 23B, dark green box). In this analysis, a three partition Bayesian clustering was inferred, where six strains from phylotype IIB-4, along with one strain from phylotype IIB-4NPB constituted cluster "a" (green bar), seven strains from phylotypes IIB-4 constituted cluster "b" (yellow bar), and one strain from each phylotype IIB-4, IIB-4NPB, and IIB-51 constituted cluster "c" (purple bar).

Discussion

This molecular approach of the *R. solanacearum* genomic diversity through pangenomic CGH microarray unraveled (i) new insights into the evolutionary past of this successful plant pathogen and (ii) a broad diversity among phylotype II strain; especially for well-known ecotypes such as Brown rot strains from phylotypes IIB-1 and IIB-2, but also Moko disease causing strains from phylotype IIB-4 and the emerging strains from phylotype IIB-4NPB.

Classification of the plant pathogen *R. solanacearum* has undergone many changes during these last 20 years. Historically, biodiversity of strains was mirrored by the race and biovar system based on phenotypic traits (Buddenhagen & Kelman, 1964; Buddenhagen, Sequeira, *et al.*, 1962; Buddenhagen, 1986). Nevertheless, this classification evolved with the new tools the genomics era provide, allowing the assessment of the relationship between widely heterogeneous organisms regarding their physiology, ecology, and genome content (Cohan & Perry, 2007; Staley, 2006). Breakthrough of DNA based technology brought new insights (Hudson, 2008) and novel classifications emerged. *R. solanacearum* is not an exception and many studies revisited its phylogenetic diversity, at the genus level (Cook, Barlow, *et al.*, 1989; Cook & Sequeira, 1994; Vaneechoutte, Kämpfer, *et al.*, 2004), at the species complex level (Fegan, Taghavi, *et al.*, 1998; Poussier, Prior, *et al.*, 2000; Villa, Tsuchiya, *et al.*, 2005), or at the ecological level (Eden-Green, 1994; Thwaites, Mansfield, *et al.*, 1999; van der Wolf, Bonants, *et al.*, 1998). Phylogeny of *R. solanacearum* has been recently revisited into four major groups called phylotypes, subdivided into sequevars (Fegan & Prior, 2005) and a proposal was made to split the *R. solanacearum* species complex into three distinct genomic species (Remenant, Coupat-Goutaland, *et al.*, 2010). Hence, the CGH pangenomic microarray developed in this study was designed as an attempt to look deeper at the genomic level in the phylogenetic diversity of *R. solanacearum* and to bring new insights into the molecular ecology of this successful plant pathogen.

Microarray validation

Assessing the microarray efficiency was mandatory to ensure meaningful data. Thus, results showed high inter-slide reproducibility (96.8%), allowing the comparison of data without replicating strains. Furthermore, high reproducibility across all Cy5 hybridizations on one hand, and between Cy3 and Cy5 hybridizations of strain CMR15 on the other hand, validates each hybridizations separately and cross-comparisons among Cy3 hybridizations. Finally, high inner-slide reproducibility value on replicate probes validates the design of the microarray without the need of replicating all probes. In term of specificity, the microarray developed in this study is characterized by both low false positive (4.8%) and false negative response (1.9%),

Table 6. Bayesian clustering analysis with STRUCTURE software on brown rot strains from phylotypes IIB-1 and IIB-2^a

| Strains | Phy ^b | Seq ^b | Country | Host | Hierarchical ^c | Structure ^d | |
|-----------|------------------|------------------|--------------|-----------------|---------------------------|------------------------|-----|
| | | | | | | Major | sub |
| CFBP4787 | IIB | 1 | Portugal | Potato | AIO | 1 | a |
| UW551 | IIB | 1 | Kenya | Pelargonium | AIO | 1 | a |
| CMR34 | IIB | 1 | Cameroon | Tomato | AIO | 1 | a |
| JT516 | IIB | 1 | Reunion | Potato | AIO | 1 | a |
| CFBP3870 | IIB | 1 | South Africa | Potato | AIO | 1 | a |
| JT646 | IIB | 1 | Sri Lanka | Potato | AIO | 1 | a |
| LNPV28.23 | IIB | 1 | Reunion | Potato | AIO | 1 | a |
| JQ1051 | IIB | 1 | Reunion | Tomato | AIO | 1 | a |
| CFBP3865 | IIB | 1 | France | Potato | EuMr | 1 | a |
| CFBP3785 | IIB | 1 | Portugal | Potato | EuMr | 1 | b |
| CFBP4812 | IIB | 1 | France | Tomato | EuMr | 1 | b |
| JQ1006 | IIB | 1 | Reunion | Potato | EuMr | 1 | b |
| CFBP3579 | IIB | 1 | France | Tomato | EuMr | 1 | b |
| CFBP4578 | IIB | 1 | Egypt | Tomato | EuMr | 1 | b |
| PSS525 | IIB | 1 | Taiwan | Potato | EuMr | 1 | b |
| LNPV19.66 | IIB | 1 | France | Potato | EuMr | 1 | c |
| RM | IIB | 1 | Uruguay | Potato | EuMr | 1 | c |
| CFBP3927 | IIB | 1 | Greece | Potato | EuMr | 1 | c |
| CFBP3884 | IIB | 1 | Sweden | Potato | North | 1 | d |
| IPO1609 | IIB | 1 | Netherlands | Potato | North | 1 | d |
| AP31H | IIB | 1 | Uruguay | Potato | Andean | 2 | |
| CFBP3784 | IIB | 1 | Portugal | Potato | Andean | 2 | |
| CFBP3873 | IIB | 1 | Belgium | Potato | Andean | 2 | |
| CFBP7103 | IIB | 1 | Spain | Potato | Andean | 2 | |
| ETAC | IIB | 1 | Uruguay | Potato | Andean | 2 | |
| CFBP3107 | IIB | 1 | Peru | Potato | Andean | 2 | |
| CFBP4808 | IIB | 1 | Israel | Potato | EuMr | 2 | |
| CFBP1410 | IIB | 2 | Colombia | Banana Plantain | | 2 | |
| CFBP3879 | IIB | 2 | Colombia | Potato | | 2 | |
| CFBP4611 | IIB | 2 | Colombia | Potato | | 2 | |
| CFBP3858 | IIB | 1 | Netherlands | Potato | Out | ND | |

^a ND refers to “not done” and *Out* referred to the outer phylogenetic position of the strain compared to its sequevar.

^b Phylotypes (*Phy*) and sequevar (*Seq*), as determined by sequencing of partial endoglucanase (*egl*) gene (Fegan & Prior, 2005).

^c Cluster determined by hierarchical clustering based on an “average” agglomerative clustering computed on a binary distance matrix using a bootstrap value of 1,000 resamplings. Names reflected the main origin of strains within the cluster: *AIO* referred to African-Indian Ocean regions; *EuMr* referred to European and Mediterranean regions; *North* referred to northern Europe regions; and *Andean* referred to Latin Americas regions.

^d Statistical groups obtained by a Bayesian clustering analysis with STRUCTURE software for K varying from 1 to 10. Population “*Major*” was assessed to K = 2 clusters, according to the likelihood of assignment decreasing from $\Delta K = 74$ for K = 1 to $\Delta K = 1.44$ for K = 6. Cluster 1 was assigned with an average inference of 0.872 and a FST value of 0.744. Cluster 2 was assigned with an average inference of 0.799 and a FST value of 0.003. Population “*Sub*” was assessed to K = 4 clusters, according to the likelihood of assignment increasing from $\Delta K = 11.210$ for K = 1 to $\Delta K = 25.814$ for K = 3, and then decreasing until K = 10. Sub-cluster *a* was assigned with an average inference of 0.837 and a FST value of 0.804; sub-cluster *b* was assigned with an average inference of 0.576 and a FST value of 0.967; sub-cluster *c* was assigned with an average inference of 0.554 and a FST value of 0.002; and sub-cluster *d* was assigned with an average inference of 0.693 and a FST value of 0.975.

allowing us to accurately rely on our experimental data.

Questions about the optimum number of strain needed in an analysis to obtain a clear view of the diversity have always been of major interest (Hogg, Hu, *et al.*, 2007; Tettelin, Massignani, *et al.*, 2005). Curves based analysis (Figure 22) demonstrated that ten hybridized strains on the pangenomic microarray were enough to drastically downsize the population of positive probe responses (core probes). More strains were analyzed in order to clearly characterize the inner-phylogroup diversity. Firstly, number of core probes for all strains (2,690) that were revealed with those curves was close to the one revealed with sequencing technology (2,543), suggesting that most of the core genes were identified. Secondly, despite a high number of core probes shared among phylotype IIB strains, this phylotype showed a great diversity. This suggests that only a limited amount of genes are involved in the genomic diversity of these strains. Furthermore, the minimal gene set (Gil, Silva, *et al.*, 2004) retrieved in *R. solanacearum* genome was targeted by at least one core probes revealed by the pangenomic microarray; this confirmed that all strains hybridized are homogeneous in the minimal gene set content.

Pangenome and the *Ralstonia solanacearum* species complex

Clustering of the 72 *R. solanacearum* strains and unique *R. pickettii* strain was performed both using a hierarchical analysis via bootstrap resamplings and a Bayesian analysis. Hierarchical clustering data clearly showed a clustering in four major divisions in the phylogeny of *R. solanacearum*, and many subdivisions, confirming the phylotypes and sequevars scheme obtained from partial *egl* sequences (Fegan & Prior, 2005). This phylogeny is also highly congruent with previous CGH microarray or genomic data (Guidot, Prior, *et al.*, 2007; Remenant, Coupat-Goutaland, *et al.*, 2010), except for phylotype IV strains which didn't appear as being phylotype II sister clade. The same phylogeny was found when the selection of probes was restricted to either the chromosome or the megaplasmid or either restricted to the type III effectors encoding genes or genes involved into pathogenicity (data not shown). This supports hypothesis of the long coevolution of those two replicons (Coenye & Vandamme, 2003; Genin & Boucher, 2004; Guidot, Prior, *et al.*, 2007) and the ancestral character of *R. solanacearum* as a plant pathogen

(Genin & Boucher, 2004). Nevertheless, Bayesian analysis unraveled new insights in the apparently monophyletic distribution of strains among the phylogeny of the species complex. Strain CFBP3858 was the only strain of phylotype IIB-1 to cluster in another group than IIB-1 or IIB-2 strains, suggesting a gene flow with Moko disease causing strains from phylotypes IIA-6 or IIB-3. Inference value of cluster membership for the strains from phylotype IIB-4 and IIB-4NPB showed that they were different from other strains, even in the same Bayesian cluster. This explains the outer phylogenetic position of strains CFBP6797 (IIB-4NPB) and CFBP7014 (IIB-51) since they showed higher inference value for the first IIB-1/IIB-2 cluster than phylotype IIB-4 and IIB-4NPB strains cluster. The third cluster was gathering strains from phylotypes I and III, along with strains from phylotype IV in a heterogeneous cluster. Compared to other clusters, the lower F_{ST} value was mainly explain by the occurrence of phylotype IV in this cluster, where those strains showed a lower inference value.

Gene content

The microarray pangenomic approach, with its high throughput capabilities, provides us the unique opportunity to assess gene content of a large number of strains and thus reconstruct the history of gene loss and acquisition along the phylogeny. We choose to focus our analysis on four gene classes involving environmental adaptation, pathogenicity, metabolism, and extrachromosomal related probe targets. Distribution of genes among the phylogeny of *R. solanacearum* was significantly different between the four described classes (Figure 24). Hence, probes from the “Extrachromosomal origin” class were found highly mobile among the phylogeny mostly with high gene gains, suggesting that they may have played an important role in the evolution of the *R. solanacearum* (Frost, Leplae, *et al.*, 2005). Pathogenicity related genes clustered into the “Pathogenesis” class were found as mobile as the class “Environmental Adaptation”, in both gene losses and gains, highlighting the probable role of this gene class in the bacterium expansion and extended host range.

Focus on the ancestral branches of the four phylotypes revealed high rearrangements and unilateral acquisitions and losses of genes, which may be a general trend of *R. solanacearum* evolution (Figure 25). Compared to the ancestral

Table 7. Bayesian clustering analysis with STRUCTURE software on Moko disease causing strains from phylotypes IIA-6, IIB-3, IIB-4, IIB-4NPB, and IIB-51.

| Strains | Phy ^a | Seq ^a | Country | Host | Hierarchical ^b | Structure ^b | |
|-----------|------------------|------------------|---------------|---------------------|---------------------------|------------------------|-----|
| | | | | | | Major | sub |
| CFBP1416 | IIB | 3 | Costa Rica | Banana Plantain | | 1 | |
| CIP417 | IIB | 3 | Philippines | Banana | | 1 | |
| CIP418 | IIB | 3 | Indonesia | Peanut | | 1 | |
| Molk2 | IIB | 3 | Philippines | Musa | | 1 | |
| UW28 | IIB | 3 | Cyprus | Potato | | 1 | |
| UW9 | IIB | 3 | Costa Rica | Heliconia | | 1 | |
| GMI8044 | IIA | 6 | Grenada | Banana | | 2 | |
| RUN394 | IIA | 6 | Grenada | Banana Bluggoe | | 2 | |
| UW181 | IIA | 6 | Venezuela | Banana Plantain | | 2 | |
| JS927 | IIA | 7 | Porto Rico | Tomato | | 2 | |
| CFBP2957 | IIA | 36 | Martinique | Tomato | | 2 | |
| CFBP2957 | IIA | 36 | Martinique | Tomato | | 2 | |
| CFBP2957 | IIA | 36 | Martinique | Tomato | | 2 | |
| UW170 | IIB | 4 | Colombia | Heliconia | 4A | 3 | a |
| CFBP6778 | IIB | 4NPB | Martinique | Tomato | NPB | 3 | a |
| CFBP6783 | IIB | 4NPB | Martinique | Heliconia | NPB | 3 | a |
| RUN432 | IIB | 4NPB | French Guiana | Water (irrigation) | NPB | 3 | a |
| IBSBF1503 | IIB | 4NPB | Brazil | Cucumber | NPB | 3 | a |
| LNPV24.25 | IIB | 4NPB | France | Tomato | NPB | 3 | a |
| JY200 | IIB | 4NPB | Martinique | Anthurium | NPB | 3 | a |
| CFBP1184 | IIB | 4 | Honduras | Musa | 4B | 3 | b |
| LNPV31.10 | IIB | 4 | French Guiana | Musa | 4B | 3 | b |
| LNPV32.36 | IIB | 4 | French Guiana | Musa | 4B | 3 | b |
| LNPV32.37 | IIB | 4 | French Guiana | Banana Plantain | 4B | 3 | b |
| LNPV32.40 | IIB | 4 | French Guiana | Musa | 4B | 3 | b |
| UW160 | IIB | 4 | Peru | Banana Plantain | 4B | 3 | b |
| UW163 | IIB | 4 | Peru | Banana Plantain | 4A | 3 | b |
| UW162 | IIB | 4 | Peru | Banana Plantain | 4A | 3 | c |
| CFBP6797 | IIB | 4NPB | Martinique | American nightshade | NPB | 3 | c |
| CFBP7014 | IIB | 51 | Trinidad | Anthurium | | 3 | c |

^a Phylotypes (*Phy*) and sequevar (*Seq*), as determined by sequencing of partial endoglucanase (*egl*) gene (Fegan & Prior, 2005).

^b Cluster determined by hierarchical clustering based on an “average” agglomerative clustering computed on a binary distance matrix using a bootstrap value of 1,000 resamplings.

^c Statistical groups obtained by a Bayesian clustering analysis with STRUCTURE software for K varying from 1 to 10. Population “*Major*” was assessed to K = 3 clusters, according to the likelihood of assignment increasing from $\Delta K = 1.858$ for K = 2 to $\Delta K = 1401.232$ for K = 3, and then decreasing until K = 10. Cluster 1 was assigned with an average inference of 0.980 and a FST value of 0.826; cluster 2 was assigned with an average inference of 0.956 and a FST value of 0.530; and cluster 3 was assigned with an average inference of 0.976 and a FST value of 0.782. Population “*Sub*” was assessed to K = 3 clusters, according to the likelihood of assignment increasing from $\Delta K = 0.948$ for K = 2 to $\Delta K = 98.391$ for K = 3, and then decreasing until K = 10. Sub-cluster *a* was assigned with an average inference of 0.881 and a FST value of 0.840; sub-cluster *b* was assigned with an average inference of 0.827 and a FST value of 0.841; and sub-cluster *c* was assigned with an average inference of 0.677 and a FST value of 0.002.

branch of all *R. solanacearum* strains, common ancestral branches of phylotypes IIA and IIB, or I and III, displayed high genes loss and gains, which suggests an ancestral divergence among those groups. This data support the hypothesis of three genomic species in the *R. solanacearum* species complex: phylotypes I-III, phylotype II, and phylotype IV (Remenant, Coupat-Goutaland, *et al.*, 2010).

As we know, strains from phylotype IIB evolved in two distinct but genetically close clusters: IIB-1 and IIB-2. Whereas the phylotype IIB common ancestral branch only showed losses and limited gain values, a high gene flux characterized by both losses and gains was revealed within the phylotype IIB strains. In contrast, phylotype IIA strains were shown to share a relative low gene flux after high gene gains in their common ancestor. This strongly indicates a diversity burst for phylotype IIB strains in a more recent event than for phylotype IIA strains. Furthermore, a massive gain of genes in the “Extrachromosomal origin” class was observed within the phylotypes IIB strains, supporting the role of this mobile element in evolution of an organism. Massive gene loss was also observed in this phylotype, supporting hypothesis of genome decay and thus a profiling towards pathogenicity (Pallen & Wren, 2007), characterized by loss of many genes no longer essential in the host environment. In a recent review, Wren (2000) discusses three possible origins for bacterial pathogenicity: lateral gene transfer, antigenic variation, and genome decay. As an ancestral pathogen, *R. solanacearum* genome had undergone drastic rearrangements, which were in favor of a pathogenicity profile. This could be linked with loss of genes during evolution and gain of mobile elements, which may be in favor of advantageous selection characteristics. The same scenario was observed for phylotypes I and III, where phylotypes III strains were following the same evolution process as phylotypes IIB: high gene losses and gains within the phylotype, but low gene flux in their ancestral branch. The fact that the ancestral branch of phylotype I strains displayed high gain values could be explained by their worldwide distribution that could have contributed to gene flow. This phylotype is also considered as polyphage with an extended host range and this amount of gain could be linked with the adaptation of these strains to multiple hosts.

When focusing on the role of chromosome and megaplasmid in the evolution of *R. solanacearum*, it appears that these two replicons

were contributing at different levels. First, while movements and losses were significantly higher on the megaplasmid, gains were significantly higher on the chromosome during evolutionary process in *R. solanacearum*. The megaplasmid appeared more flexible than the chromosome and showed high genes gain in the ancestor branch of phylotype IIA strains, while the chromosome was showing high genes gain in the common ancestor branch of phylotype I strains. This supports observations that the chromosome is more conserved across *R. solanacearum* strains than the megaplasmid, with a great amount of housekeeping genes (Remenant, Coupat-Goutaland, *et al.*, 2010; Salanoubat, Genin, *et al.*, 2002).

Pangenome and population structure in ecotypes Moko and Brown rot

A wide diversity within the phylogeny of *R. solanacearum* was unraveled among strains clustering into the cold tolerant potato Brown rot phylotypes IIB-1 and IIB-2, and also in the tropical banana Moko disease-causing strains in phylotype IIB-4. Both hierarchical and Bayesian clustering on Brown rot strains unraveled two major distinct clusters among those strains. Surprisingly, whereas the hierarchical clustering showed the same distribution of strains into the two clusters than into sequevar, Bayesian clustering showed a different distribution: strains: phylotype IIB-2 was assigned to the major cluster 2, along with strains from phylotype IIB-1 referred as “Andean”. From our knowledge, potato (*S. tuberosum*) originated in the highlands of Central America and this result suggests a long co-evolution with Brown rot strains from phylotypes IIB-1 and IIB-2, before evolving in phylogenetically distinct clusters. This “Andean” cluster, which could be referred as the Andean Brown rot strains, was significantly different from phylotype IIB-1 strains of the major cluster 1. Although phylotype IIB-1 was historically considered as clonal (Cellier & Prior, 2010; Hayward, 1991; Janse, 1996; Timms-Wilson, Bryant, *et al.*, 2001; van der Wolf, Bonants, *et al.*, 1998), it is the first time these strains disclosed unsuspected but highly significant ancestral level of heterogeneity.

Furthermore, focus on the major cluster 1 revealed at least four sub-clusters within those strains, linked with their geographical isolation or their recognized capacity to distribute worldwide with long history of plant materials movement. The hierarchical cluster “EuMr” that referred to strains mainly originating from Europe was

phylogenetically heterogeneous, and partitioned into two Bayesian clusters: “b” and “c”. Cluster “b” was assigned with a high F_{ST} value of 0.967, whereas the cluster “c” was assigned with a low F_{ST} value of 0.015, showing a great genetic diversity among the cluster “c”, compare to a high clonal tendency of cluster “b”. Low average inference value for both cluster “b” and “c” is explained by a heterogeneous distribution of inference of cluster membership value, mainly among these two clusters. This strongly indicates gene flow event between those two European Brown rot populations. Strain PSS525, isolated in Taiwan from potato, was assigned to the European cluster and strongly supports the report of European Brown rot strains introduction in Taiwan through potato material (P. Prior, not published; J-F Wang, personal communication). The same scenario was observed for strain JQ1006 isolated in Reunion, which was assigned to the European cluster from where it was introduced (J.-J. Chéron, personal communication).

The hierarchical cluster “AIO”, referring to a geographical origin mainly in Africa and Indian Ocean, was consistent with the Bayesian cluster “a”. This cluster is described as homogeneous (high F_{ST} value of 0.804 and a high inference average value of 0.837), suggesting a limited gene flow into this population and an endemic state to African and Indian Ocean, thus confirming research on African Brown rot strain (Mahbou Somo Toukam, Cellier, *et al.*, 2009; Poussier, Trigalet-Demery, *et al.*, 2000; Poussier, Vandewalle, *et al.*, 1999).

Among African and European Brown rot population, three strains showed that gene flow event occurred within those populations. Isolated in France from potato, strain CFBP3865 was assigned as hierarchical cluster “EuMr” and African Bayesian cluster “a” with an inference value of 0.460. Nevertheless, the inference value for this strain among European Bayesian cluster “c” was 0.418, which suggests that CFBP3865 is a hybrid between African-Indian Ocean and European population. The two strains CFBP3785, isolated in Portugal from potato, and CFBP4812, isolated in France from tomato, also showed hybrid characteristics. They were assigned to both European hierarchical and Bayesian clusters, but showed close inference values for both African and European Bayesian clusters. This strongly supports hypothesis of African Brown rot phylotype IIB-1 strains introduction in Europe (Janse, 1996; Janse, van den Beld, *et al.*, 2004). The same gene flow event appeared in the

major cluster 1 and 2, where two strains isolated from potato (CFBP3873 in Belgium and CFBP4808 in Israel), displayed equivalent levels of membership to those clusters. Hence, two distinct events of introduction may explain the diversity of Brown rot strains observed in Europe: a former Andean origin that moved around world-wide with potato material and a closer African-Indian Ocean organism that had no chance to distribute elsewhere due to the lack of potato production as a historical subsistence food crop.

The hierarchical cluster “North” correlated with the Bayesian cluster “d” and refers to strain originating from northern Europe: Netherlands and Sweden. Strain IPO1609 was isolated by Jaap Janse in 1995 and CFBP3884 was isolated by Karen Ollson and received by J. Janse in 1980 (J. Janse, personal communication). These two strains were clearly distinct from the other IIB-1 clusters. Strain IPO1609 was recently found to have a large DNA deletion of 68Kb (Gonzalez, Restrepo, *et al.*, 2010). This region has been found present in GMI1000 and UW551 but absent from IPO1609 and encodes 43 genes on the chromosome, where 2 genes encoded products related to pathogenicity traits. The high similarity between IPO1609 and CFBP3884 and the negative probes signal targeting this region, confirmed by replicates (data not shown), strongly indicate that this deletion has occurred in both strains. Hence, this deletion event is not an exception in *R. solanacearum*. Both IPO1609 and CFBP3884 also showed avirulence against potato genetic resource used to characterize their phenotype (Cellier & Prior, 2010) and IPO1609 was known to show limited virulence on *Solanaceae* (Mahbou Somo Toukam, Cellier, *et al.*, 2009). Deletion on UW551 of the same DNA fragment induced a virulence reduction (Smith, Smith, *et al.*, 1993). Thus, this deletion could be involved into the virulence depression but was not the only gene content difference between the cluster “North” and those distributing in clusters “a” and “b”. The pangenomic microarray used in this study revealed a difference of 91 genes, from which 8 were involved in pathogenicity. Nevertheless, avirulence on potato and general low pathogenicity profile of strains IPO1609 and CFBP3884 could also be linked with regulation related mechanisms and thus, more data is needed to make a decision.

From these phylogenetic data and for the first time, an unsuspected diversity was described among Brown rot strain from phylotype IIB-1 and IIB-2, which could be correlated to

geographic distribution and evolution history. Data obviously showed that strains from Africa and Indian Ocean have been limitedly exposed to gene flow, whereas European strains, which have undergone gene flow events, either from Latin Americas or from African regions.

Analysis of the Moko disease-causing strains as a particular ecotype also revealed unsuspected phylogenetic diversity. These strains distributed into phylotypes IIA-6, IIB-3, and IIB-4. Strains in sequevar 4NPB clustered with the sequevar 4 and gathered emerging strains from French West Indies (Wicker, Grassart, *et al.*, 2007). Sequevar 4NPB differed from Moko disease causing strains since they showed the highest aggressiveness on *Solanaceae* along with Brown rot phylotype IIB-1 strains (Cellier & Prior, 2010) and are not pathogenic to banana. Thus, in the phylotype/sequevar classification, these emerging strains were not distinct from the sequevar 4, although their pathogenicity was clear-cut different. In this study, data showed that both hierarchical and Bayesian clustering correlated clusters with sequevars and discriminated sequevar 4 and 4NPB. A focus on these two sequevars revealed two distinct clusters in sequevar 4 and one other distinct cluster that separated emerging strains sequevar 4NPB from sequevar 4. Bayesian clustering revealed that strains from hierarchical cluster “4a” were different from hierarchical cluster “4b” since they showed gene flow event with emerging strains from sequevar 4NPB. Thus, we could hypothesize a genetic event that triggered the genetic split between those two groups. What happens next could be formulated into two hypotheses: the specialization of strains from 4NPB to *Solanaceae* relative host plants and the loss of pathogenicity within sequevar 4NPB towards banana. This first hypothesis states sequevar 4 as the common ancestor and considers emerging strains as emerging (Wicker, Grassart, *et al.*, 2009). The second hypothesis tends to view this problematic backwards, by stating sequevar 4NPB as the common ancestor and thus, the acquisition of banana pathogenicity by sequevar 4 strains, supported by the fact that Moko causing strains are able to wilt *Solanaceae* (Cellier & Prior, 2010). The particular case of strain CFBP7014, a newly described sequevar 51, is also a matter of interest since this sequevar phylogenetically differed from Moko disease causing strains and emergent strains. Strain CFBP7014, previously characterized as sequevar 4NPB by PCR (Wicker, Grassart, *et al.*, 2007), was assigned in-between and close to sequevars 4 and 4NPB, but different enough to appear as an

outlier. This strain was shown to be highly pathogenic on sensitive *Solanaceae* and established as latent infection on resistant *Solanaceae*, but did not penetrate into banana plants (Cellier & Prior, 2010). Thus, as strains from sequevar 4NPB in French West Indies, strain CFBP7014 might be considered an emergent pathological variant in Trinidad.

This study brought new insights into diversity aspects of *R. solanacearum*, especially towards evolutionary past of this plant pathogen and on phylotypes II and its two ecotypes: Brown rot and Moko-causing strains. More researches are still needed to characterize mechanisms explaining relationship between genomics and hosts specialization. Nevertheless, the use of the pangenomic microarray developed in this study provides a resolution never reached to date for the *R. solanacearum* diversity studies.

Acknowledgments

We thank institutions cited in the text for courtesy sharing strains of *Ralstonia solanacearum*, and the supercomputer TITAN, Saint Denis, *Université de la Réunion*, for statistical analysis computation. This work was funded by the *Fédération Nationale des Producteurs de Plantes de Pommes de Terre*, Mission-DAR, Grant-7124 of the French Ministry of Food, Agriculture, and Fisheries. The European Regional Development Fund (ERDF) of the European Union, *Conseil Régional de La Réunion* also provided financial support as part of Biorisk program developed at CIRAD. Inra for PARASOL project as regards the pangenomic DNA microarray.

References

- Alfano, J. R., & Collmer, A. (1996). Bacterial Pathogens in Plants: Life up against the Wall. *Plant Cell*, 8(10), 1683-1698.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402.
- Andersson, J. O., & Andersson, S. G. (1999). Insights into the evolutionary process of genome degradation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 9(6), 664-671.
- Bertolla, F., Van Gijsegem, F., Nesme, X., & Simonet, P. (1997). Conditions for natural transformation of *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4965-4968.
- Buddenhagen, I., & Kelman, A. (1964). Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 2, 203-230.

- Buddenhagen, I., Sequeira, L., & Kelman, A. (1962). Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 52, 726.
- Buddenhagen, I. W. (1986). *Bacterial wilt revisited*. Paper presented at the Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific: proceedings n°13 of an international workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines, 8-10 October 1985, Canberra, Australia.
- Cellier, G., & Prior, P. (2010). Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains pathogenic to potato. *Phytopathology*, 100(10), 1250-1261.
- Coenye, T., & Vandamme, P. (2003). Simple sequence repeats and compositional bias in the bipartite *Ralstonia solanacearum* GM11000 genome. *BMC Genomics*, 4.
- Cohan, F. M., & Perry, E. B. (2007). A systematics for discovering the fundamental units of bacterial diversity. *Current Biology*, 17(10), R373-386.
- Cook, D., Barlow, E., & Sequeira, L. (1989). Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment polymorphisms with DNA probes that specify virulence and hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2, 113-121.
- Cook, D., & Sequeira, L. (1994). Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In A. C. Hayward & G. L. Hartman (Eds.), *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (pp. 77-93). Wallingford, United Kingdom: CAB International.
- Coupat, B., Chaumeille-Dole, F., Fall, S., Prior, P., Simonet, P., Nesme, X., & Bertolla, F. (2008). Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and size of DNA that can be transferred. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(1), 14-24.
- Dangl, J. L. (1994). The enigmatic avirulence genes of phytopathogenic bacteria. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 192, 99-118.
- Eden-Green, S. J. (1994). Diversity of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria in South East Asia: new direction for moko disease. In A. C. Hayward & G. L. Hartman (Eds.), *Bacterial wilt: the disease and its causative organism, Pseudomonas solanacearum* (pp. 25-34). Wallingford, United Kingdom: CAB International.
- Eisen, J. A. (2000). Horizontal gene transfer among microbial genomes: new insights from complete genome analysis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10(6), 606-611.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611-2620.
- Fegan, M., & Prior, P. (2005). How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex". In C. Allen, P. Prior & A. C. Hayward (Eds.), *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex* (pp. 449-461). St Paul, MN: APS Press.
- Fegan, M., Taghavi, M., Sly, L. I., & Hayward, A. C. (1998). Phylogeny, diversity and molecular diagnostics of *Ralstonia solanacearum*. In P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone (Eds.), *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects* (pp. 19-33). Paris, France: INRA Editions.
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 722-732.
- Gabriel, D. W., Allen, C., Schell, M., Denny, T. P., Greenberg, J. T., Duan, Y. P., . . . Mikhailova, N. (2006). Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(1), 69-79.
- Genin, S. (2010). Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytologist*, 187(4), 920-928.
- Genin, S., & Boucher, C. (2004). Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 42(1), 107-134.
- Gil, R., Silva, F. J., Pereto, J., & Moya, A. (2004). Determination of the core of a minimal bacterial gene set. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 518-537.
- Gonzalez, A., Restrepo, S., Boucher, C., & Genin, S. (2010). Identification of new determinants required to the pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* "race 3" (potato strains). Paper presented at the The 12th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Saint Denis, La Reunion, France.
- Guidot, A., Coupat, B., Fall, S., Prior, P., & Bertolla, F. (2009). Horizontal gene transfer between *Ralstonia solanacearum* strains detected by comparative genomic hybridization on microarrays. *The ISME Journal*, 3(5), 549-562.
- Guidot, A., Prior, P., Schoenfeld, J., Carrere, S., Genin, S., & Boucher, C. (2007). Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *Journal of Bacteriology*, 189(2), 377-387.
- Hayward, A. C. (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 29, 67-87.
- Hayward, A. C. (1994). The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In A. C. Hayward & G. L. Hartman (Eds.), *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (pp. 9-24). Wallingford: CAB International.
- Hogg, J. S., Hu, F. Z., Janto, B., Boissy, R., Hayes, J., Keefe, R., . . . Ehrlich, G. D. (2007). Characterization and modeling of the *Haemophilus influenzae* core and supragenomes based on the complete genomic sequences of Rd and 12 clinical nontypeable strains. *Genome Biology*, 8(6), R103.
- Hudson, M. E. (2008). Sequencing breakthroughs for genomic ecology and evolutionary biology. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 3-17.
- Janse, J. D. (1996). Potato brown rot in western Europe - history, present occurrence and some remarks on possible origin. *EPPO Bulletin*, 26(3-4), 17.
- Janse, J. D., van den Beld, H. E., Elphinstone, J., Simpkins, S., Tjou-Tam-Sin, N. N. A., & van Vaerenbergh, J. (2004). Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. *Journal of Plant Pathology*, 86(2), 147-155.
- Mahbou Somo Toukam, G., Cellier, G., Wicker, E., Guilbaud, C., Kahane, R., Allen, C., & Prior, P. (2009). Broad Diversity of *Ralstonia solanacearum* Strains in Cameroon. *Plant Disease*, 93(11), 1123-1130.
- Metzgar, D., & Wills, C. (2000). Evolutionary changes in mutation rates and spectra and their influence on

- the adaptation of pathogens. *Microbes and Infection*, 2(12), 1513-1522.
- Moxon, E. R., Rainey, P. B., Nowak, M. A., & Lenski, R. E. (1994). Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Current Biology*, 4(1), 24-33.
- Ochman, H., Lawrence, J. G., & Groisman, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405(6784), 299-304.
- Pallen, M. J., & Wren, B. W. (2007). Bacterial pathogenomics. *Nature*, 449(7164), 835-842.
- Paradis, E., Claude, J., & Strimmer, K. (2004). APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics*, 20(2), 289-290.
- Petrov, D. A. (2001). Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends in Genetics*, 17(1), 23-28.
- Poussier, S., Prior, P., Luisetti, J., Hayward, C., & Fegan, M. (2000). Partial sequencing of the *hrpB* and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Systematic and Applied Microbiology*, 23(4), 479-486.
- Poussier, S., Trigalet-Demery, D., Vandewalle, P., Goffinet, B., Luisetti, J., & Trigalet, A. (2000). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. *Microbiology*, 146 (Pt 7), 1679-1692.
- Poussier, S., Vandewalle, P., & Luisetti, J. (1999). Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hrp* gene region. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 2184-2194.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- R Development Core Team. (2009). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <http://www.R-project.org>
- Remenant, B., Coupat-Goutaland, B., Guidot, A., Cellier, G., Wicker, E., Allen, C., . . . Prior, P. (2010). Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics*, 11, 379.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., . . . Boucher, C. A. (2002). Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*, 415(6871), 497-502.
- Sheather, S. J., & Jones, M. C. (1991). A Reliable Data-Based Bandwidth Selection Method for Kernel Density Estimation. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B. Statistical Methodology*, 53(3), 683-690.
- Silverman, B. W. (1986). *Density Estimation*. London: Chapman and Hall.
- Smith, J. M., Smith, N. H., O'Rourke, M., & Spratt, B. G. (1993). How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(10), 4384-4388.
- Staley, J. T. (2006). The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 361(1475), 1899-1909.
- Stouthamer, A. H., & Kooijman, S. A. L. M. (1993). Why it pays for bacteria to delete disused DNA and to maintain megaplasmids. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 63(1), 39-43.
- Taghavi, M., Hayward, C., Sly, L. I., & Fegan, M. (1996). Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(1), 10-15.
- Tettelin, H., Massignani, V., Cieslewicz, M. J., Donati, C., Medini, D., Ward, N. L., . . . Fraser, C. M. (2005). Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13950-13955.
- Thwaites, R., Mansfield, J., Eden-Green, S., & Seal, S. (1999). RAPD and rep PCR-based fingerprinting of vascular bacterial pathogens of *Musa* spp. *Plant Pathology*, 48(1), 121-128.
- Timms-Wilson, T. M., Bryant, K., & Bailey, M. J. (2001). Strain characterization and 16S-23S probe development for differentiating geographically dispersed isolates of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Environmental Microbiology*, 3(12), 785-797.
- van der Wolf, J. M., Bonants, P. J. M., Smith, J. J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., van Beckhoven, J. R. C. M., . . . Feuillade, R. (1998). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* race 3 in Western Europe determined by AFLP, RC-PFGE and Rep-PCR. In P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone (Eds.), *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects* (pp. 44-49). Berlin, Germany: Springer Verlag.
- van Valen, L. (1973). A new evolutionary law. *Evolutionary Theory*, 1, 1-30.
- Vaneechoutte, M., Kämpfer, P., De Baere, T., Falsen, E., & Verschraegen, G. (2004). *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(2), 317-327.
- Villa, J. E., Tsuchiya, K., Horita, M., Natural, M., Opina, N., & Hyakumachi, M. (2005). Phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* species complex strains from Asia and other continents based on 16S rDNA, *endoglucanase*, and *hrpB* gene sequences. *Journal of General Plant Pathology*, 71(1), 39-46.
- Vinogradov, A. E. (2004). Evolution of genome size: Multilevel selection, mutation bias or dynamical chaos? *Current Opinion in Genetics & Development*, 14(6), 620-626.
- Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., Guilbaud, C., Fegan, M., & Prior, P. (2007). *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), 6790-6801.
- Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., & Prior, P. (2009). Epidemiological evidence for the emergence of a new pathogenic variant of

- Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies). *Plant Pathology*, 58(5), 853-851.
- Wren, B. W. (2000). Microbial genome analysis: insights into virulence, host adaptation and evolution. *Nature Reviews Genetics*, 1(1), 30-39.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., & Nishiuchi, Y. (1995). Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. *Microbiology and Immunology*, 39(11), 897-904.

Conclusions partielles

Le but de cette étude était l'analyse approfondie de la diversité des souches de phylotype II, en particulier les écotypes Brown rot et Moko, tout en prenant en compte les aspects évolutifs qui ont permis à *R. solanacearum* d'être un agent pathogène de plante si bien adapté. Pour ce faire, une puce à ADN basée sur le pangénome a été développée, avec l'objectif d'obtenir plus de résolution dans le discernement de la structure des complexes clonaux. Il est évident que dans un futur proche, nous allons descendre le niveau d'analyse jusqu'au gène et décrire ainsi les répertoires de gènes permettant de discriminer de façon précise les groupes de souches identifiés dans cette étude. Cependant, nous nous sommes attachés ici à une description plus générale dans le but de présenter des hypothèses concernant les mécanismes ancestraux de l'évolution.

Ainsi, un résultat majeur ressort de cette étude : les souches appartenant à l'écotype Brown rot sont désormais caractérisées en groupes qui tendent à refléter l'origine géographique des souches, comme le permet la classification de Fegan et Prior (2005) pour les phylotypes. Il apparaît donc que l'origine ou plutôt les origines sont liées aux régions d'Amérique Latine (Andes) et d'Afrique. La population européenne a été caractérisée comme hybride entre ces deux origines, montrant une situation épidémiologique double pour ce territoire. Les analyses nous ont aussi fournis des éléments de réponses sur l'évolution des souches Brown rot andines entre les sequevars 1 et 2. Il a été montré une grande proximité des souches d'origine géographique andine, quelque soit le sequevar Brown rot considéré. Ceci suggère donc un ancêtre commun à ces deux groupes, dont l'évolution a induit leur séparation phylogénétique : les souches de sequevar 1 ont pu faire l'acquisition de l'adaptation aux basses températures et trouver un nouvel habitat en Europe, alors que les souches de sequevar 2 ne présentent pas cette propriété et n'ont d'ailleurs pas été retrouvées sur le territoire européen. Appuyé par ces observations, les souches Brown rot de sequevar 1 pourraient avoir émergé des souches Brown rot de sequevar 2, comme clone virulent adapté au froid.

Un second résultat original concerne l'écotype Moko pour lequel le niveau de résolution de la diversité permet une séparation claire entre les souches Moko du sequevar 4 et les souches émergentes de sequevar 4NPB. Il est aussi montré la séparation des souches de sequevar 4 en deux groupes, dont l'un est proche des souches émergentes et pour lequel la recombinaison de gènes entre ces souches est probable. L'émergence des souches de sequevar 4NPB peut alors s'expliquer soit par l'évolution de souches de sequevar 4, soit par le fait que ces souches 4NPB sont les ancêtres de ce sequevar Moko.

Enfin, cette étude nous a permis de discuter des mécanismes évolutifs ancestraux qui ont organisé la diversité chez *R. solanacearum* vers ce que nous tentons de percevoir aujourd'hui. Les branches ancestrales des phylotypes ont subi de multiples gains et pertes de gènes, sans que nous puissions voir les mutations de ces gènes. Cependant, il ressort de cette analyse que de nombreuses réorganisations ont effectivement eu lieu dans les états ancestraux des phylotypes, dont certaines classes de gènes sont apparues comme explicites. Ainsi, les éléments mobiles ont été significativement caractérisés par des acquisitions tout au long de la phylogénie chez *R. solanacearum*. De la même façon, les gènes relatifs à la pathogénie ont subi de nombreux gains et peu de pertes, alors que ceux liés à l'adaptation environnementale sont caractérisés à la fois par de nombreux gains, mais aussi par de nombreuses pertes. La conclusion qui peut être formulée de cette analyse est que les répertoires des gènes expliquent la diversité de *R. solanacearum* dans des clusters de souches adaptées à un environnement changeant. Cependant, il apparaît aussi qu'il n'est pour l'instant pas possible de lier un pathotype donné, voire à un niveau d'agressivité variable un répertoire de gène particulier. En effet, il serait réducteur de ne pas considérer les nombreuses interactions que cet organisme entretient avec son environnement, pour lesquelles il existe des régulations fines. Les phénomènes évolutifs qui ont conduit à la description de *R. solanacearum*, tel qu'on le connaît aujourd'hui, se sont organisés en sélectionnant les adaptations environnementales successives qui ont permis à cet agent pathogène de se maintenir et de développer une diversité exceptionnelle. Différents plans de l'évolution contribuent à la diversité observée et à l'adaptation de cet organisme, et se retrouvent aussi bien au niveau de l'évènement majeur de l'acquisition du mégaplasme, des mécanismes d'acquisition d'ADN exogène, jusqu'à la mutation ponctuelle conduisant à l'inactivation d'un gène.

Néanmoins, le contenu en gène spécifique pour un groupe de souches d'intérêt stratégique pourra être exploité pour produire des marqueurs spécifiques pour leur détection et donc contribuer à enrichir l'approche épidémiologique par une meilleure résolution du diagnostic chez *R. solanacearum*. Ces informations pourraient s'avérer très utiles pour le suivi des populations de souches. Une des applications des résultats de ma thèse devait être la production d'une puce à ADN dédiée aux diagnostics de ces groupes de souches d'intérêt. Les recherches vont toujours dans ce sens et il est envisagé de tester ces marqueurs sur une grande quantité de souches pour confirmer leur spécificité.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

La démarcation des espèces bactérienne a d'abord été basée sur le phénotype et le regroupement génotypique des souches (Goodfellow, Manfio, *et al.*, 1997). Primairement, les espèces bactériennes étaient donc perçues comme des groupements de souches possédant un phénotype commun, basé généralement sur un métabolisme analogue (Sneath, 1977).

In fine, la systématique a pour ambition de présenter une classification des espèces qui permet de distinguer des entités évolutives. Cependant, alors que la notion d'espèce semble être largement acceptée par la communauté scientifique s'agissant des Eucaryotes, force est de constater l'absence de consensus clair pour énoncer le concept d'espèce chez les bactéries. En effet, chez les bactéries, le concept d'espèce est associé à une définition purement empirique, puisque résolu par des expérimentations basées sur l'hybridation ADN/ADN (Stackebrandt, Frederiksen, *et al.*, 2002). Mais comme les bactéries ont un type de multiplication clonale, des groupes génétiquement cohérents ont évolué par des processus de sélections, fortement influencés par l'adaptation à des niches écologiques particulières. Dans ces travaux nous mettons en évidence des degrés de diversité génomique qui pourraient tout aussi bien être retenus arbitrairement pour définir l'espèce bactérienne (ANI se substituant aux hybridations ADN/ADN soutenus par des données de type schéma MLSA/MLST). Le concept d'espèce écologique arrive alors naturellement si l'on considère qu'un corpus de traits génétiques particuliers unifie l'espèce bactérienne et si on lui associe des traits écologiques spécifiques. C'est ainsi que nous pouvons utilement conserver cette définition de travail lorsque nous évoquons les écotypes chez *R. solanacearum*.

Il est évident que la classification basée sur l'analyse des séquences des génomes complets remplacera de façon progressive la classification historique, pour la plupart des espèces bactériennes (Wayne, Brenner, *et al.*, 1987). Ainsi, alors que depuis des décennies la méthode principale se basait sur le génome entier par des hybridations ADN-ADN (Johnson, 1973; Wayne, Brenner, *et al.*, 1987), les clusters phylogénétiques sont désormais établis sur des analyses des ARNr (Stackebrandt & Goebel, 1994), sur les gènes codant des protéines (Palys, Berger, *et al.*, 2000; Palys, Nakamura, *et al.*, 1997), ainsi que sur de nombreuses séquences de gènes de ménage. Ces outils moléculaires ont permis de développer une nouvelle classification hiérarchique pour assigner les différentes souches de *R. solanacearum* en phylotypes et sequevar (Fegan & Prior, 2005). Elle permet par ailleurs de refléter l'origine géographique des souches (Villa, Tsuchiya, *et al.*, 2005). De plus, contrairement à tout autre système précédent, cette classification est additive : la phylogénie décrite gagnera en robustesse avec le nombre croissant de souches caractérisées par ce modèle. L'ensemble

permettant à terme d'apprécier l'évolution du complexe d'espèces *R. solanacearum*, tout en considérant des notions de phylogéographie. Le regroupement de certaines souches en écotypes permet aussi une tentative de prédiction du comportement de toutes nouvelles souches assignées dans un écotipe précédemment caractérisé. Nous avons donc appliqué ces outils moléculaires à la caractérisation des souches nouvellement décrites de phylotypes III. Ce groupe de souches a éveillé une attention particulière du fait de son caractère endémique aux régions africaines et de l'Océan Indien (Cellier & Prior, 2010). Certains rapports faisaient état de la présence de souches capables de flétrir des *Solanaceae* à des températures froides. Les données expérimentales produites ont montré que ces infections étaient à la fois provoquées par des souches de phylotypes IIB-1, mais aussi par des souches de phylotypes III, signalant une forte convergence phénotypique entre ces deux groupes de souches phylogénétiquement distantes (Mahbou Somo Toukam, Cellier, *et al.*, 2009). Cependant, le caractère endémique, la description relativement récente et donc la faible mobilité (voire l'absence) de ces souches de phylotype III au plan international, font que la culture de la pomme de terre dans le monde est particulièrement concernée aujourd'hui par l'écotype des Andean Brown rot de phylotype IIB-1.

1 Les écotypes

L'adaptation à l'hôte par la dynamique des génomes : Koepel & Cohan

La compréhension de l'écologie microbienne et de l'évolution de ces communautés ne peut être abordée que s'il existe une méthodologie pour démarquer, parmi les vastes et diverses populations de cellules bactériennes dans une communauté naturelle, les groupes impliqués dans des rôles écologiques distincts : les écotypes (Koeppel, Perry, *et al.*, 2008). Pour Cohan (2001), les écotypes sont définis comme un groupe de souches ayant une niche écologique identique ou très similaire ; définition qui rejoint celle précédemment énoncée par Koeppel. Mais, afin de comprendre les enjeux de la caractérisation d'un écotipe, il faut auparavant s'intéresser aux processus ancestraux qui gouvernent l'évolution d'une population bactérienne. En effet, les membres d'une espèce peuvent être à tout moment les fondateurs ancestraux d'une nouvelle population (Templeton, 1989). Ces écotypes peuvent étendre leur diversité en accumulant des mutations ou en recevant du matériel génétique d'autres écotypes, qu'ils soient de la même espèce ou non. Ces mutations seront purgées par sélection naturelle, du moment qu'elles reflètent une divergence mineure avec l'écotype d'appartenance et qu'elles sont soumises à de faibles pressions de sélection (Cohan, 1994). La pérennisation d'un mutant ou d'un recombinant ne peut se faire que s'il parvient à « échapper » à la sélection purificatrice et fondera ainsi un nouvel écotipe possédant son propre cycle de sélection purificatrice (Cohan, 2001). Ce phénomène évolutif explique la

présence de complexes clonaux évoluant autour d'un ancêtre, et montrant parfois une adaptation environnementale bénéficiant à l'organisme muté. L'adaptation au froid des souches Andean Brown rot (IIB-1) et African Brown rot (III) sont de bons exemples d'écotypes ayant évolué à partir d'une acquisition de compétence permettant de s'adapter à une nouvelle niche écologique ; ici la tolérance au froid et la spécialisation parasitaire à la pomme de terre. Ces souches se démarquent ainsi assez clairement de celles ne pouvant exprimer leur pouvoir pathogène qu'à des températures tropicales chaudes. Il a d'ailleurs été montré que la tolérance au froid est une propriété qui résulte de l'interaction avec les tissus de la plante (Milling, Meng, *et al.*, 2009). En effet, en dehors de la plante hôte il apparaît que la survie des souches IIB-1 n'est pas différente de celles d'autres souches assignées dans les autres groupes phylogénétiques. La description de souches de phylotypes III présentant aussi une forte tolérance au froid fait planer une nouvelle menace pour la production maraîchère en climat tempéré ; d'où l'importance stratégique de mieux connaître ces souches. Cependant, dans nos conditions expérimentales, les tests sur plantes n'ont pas pu aboutir à une vérification des propriétés de tolérance au froid des souches du groupe African Brown rot (III) (Cellier & Prior, 2010).

Comme annoncée dans l'introduction de ce chapitre, la définition des écotypes doit aussi intégrer le fait que les souches d'un même écotpe doivent partager des traits génétiques qui leur sont propres, comme l'appartenance à un groupe monophylétique dans une classification phylogénétique basée sur des séquences géniques (Cohan, 2001). L'écotype Andean Brown rot IIB-1 suit cette règle et nous manquons de données expérimentales pour pouvoir affirmer que c'est aussi le cas pour l'écotype African Brown rot (III). Cependant, à la fois la position phylogénétique et la définition de l'écotype ont été mises à l'épreuve pour caractériser les souches provoquant la maladie de Moko sur *Musaceae* (bananier, plantain, héliconia). Deux faits importants sont à considérer : (i) l'écotype Moko rassemble des souches distribuées dans les phylotypes IIA-6, IIB-3, IIB-4 et IIB-24 ; ce dernier n'a d'ailleurs pas été décrit dans ma thèse par manque de souches et est issu du démantèlement du sequevar 5 ; et (ii) l'écotype Moko, dans le sequevar 4, inclus des variants phénotypiques considérés comme des souches émergentes : le sequevar 4NPB (Wicker, Grassart, *et al.*, 2007). Les souches de sequevars 4NPB étaient jusqu'alors phylogénétiquement indiscernables des sequevars 4 (Cellier et coll. en préparation, chapitre 5) et possèdent un pouvoir pathogène élevé sur *Solanaceae*, *Cucurbitaceae* et ornementales (Wicker, Grassart, *et al.*, 2002). D'autre part les souches de l'écotype Moko montrent une spécialisation évidente pour les *Musaceae*, mais sont aussi capables de flétrir les *Solanaceae* (Cellier & Prior, 2010). La spécialisation sur *Musaceae* a probablement était rapidement acquis par un mécanisme génétique exceptionnel : ces souches alors inconnues, émergent dans les années 60 où elles éradiquent quasiment la variété Bluggoe en descendant le bassin amazonien à

partir d'Amérique Centrale. Plus tard, inféodées à leur hôte cultivé en monoculture sur des milliers d'hectares, elles subiront un phénomène d'isolement géographique. Au plan épidémiologique, ces souches Moko ont une probabilité quasi nulle de s'établir dans une culture de plein champ de type tomate, par exemple. Cependant, si on leur fournit l'opportunité expérimentale, ces souches sont toujours parfaitement capables de coloniser les « niches écologiques » *Musaceae* et *Solanaceae* et elles soulèvent donc des interrogations légitimes sur lesquelles nous reviendrons quant à leur passé évolutif.

Les écotypes et les épidémies : Beres

La connaissance actuelle de la dispersion spatiale et temporelle des souches bactériennes responsables d'épidémies manque de précision (Beres, Carroll, *et al.*, 2010). Notre compréhension de ces phénomènes est biaisée par plusieurs facteurs, tels que le manque de bases de données complètes d'individus représentatifs de l'épidémie considérée et la taille importante des génomes bactériens, en comparaison à ceux des virus par exemple. Or, il est d'une importance capitale de comprendre les modalités et les vitesses de mouvements de ces populations bactériennes dans le monde, aussi bien au niveau des domaines de la santé publique, avec la prévention sanitaire, qu'au niveau des domaines de la recherche, avec la description des mécanismes évolutifs et l'acquisition de propriétés relatives à la pathogénie (qui reste l'exception dans le monde bactérien). L'image classique que l'on a des bactérioses épidémiques est celle d'un événement récent causé par une population clonale homogène dans son expression de la virulence envers son ou ses hôtes. Il s'avère que les épidémies sont source de diversification par l'apparition de clones émergents organisés en complexes clonaux, arborant des caractéristiques parfois différentes (Beres, Carroll, *et al.*, 2010). Ainsi, il est à prévoir de nombreux changements dans la perception des épidémies, car jusqu'à présent, la caractérisation de telle population ne se faisait que par le biais de techniques identifiant de très faibles portions de génome. Ainsi, il était (est toujours) utilisé le séquençage partiel de gènes et *in extenso* les schémas MLST, ou la caractérisation de la taille du génome par PFGE (pulsed-field gel electrophoresis). L'évolution de la caractérisation des structures d'apparences clonales requiert désormais une technologie d'analyse plus fine (Foxman, Zhang, *et al.*, 2005) et tend vers une prise en compte globale de tous les gènes du génome de l'organisme, jusqu'à l'ensemble des gènes de l'espèce : le pangénome.

C'est dans cette optique que nous avons décidé de caractériser de façon approfondie les deux écotypes majeurs de *R. solanacearum* : les souches Andean Brown rot (IIB-1) et les souches provoquant la maladie de la Moko. Nous avons donc premièrement formulé l'hypothèse de l'existence d'une structuration encore non dévoilée dans la population de l'écotype Brown rot, constituant le phylotype IIB-1. Dans la littérature, l'utilisation de marqueurs neutres a clairement établi une structuration clonale de ce groupe de souche

(Hayward, 1991; Janse, 1996; Timms-Wilson, Bryant, *et al.*, 2001; van der Wolf, Bonants, *et al.*, 1998), avec de faibles variations génotypiques (Poussier, Trigalet-Demery, *et al.*, 2000). Nos observations sur les interactions avec la plante reflétaient cependant des différences significatives dans l'expression de la virulence au sein de ce groupe (Cellier & Prior, 2010). Enfin, le pouvoir pathogène généralement élevé dans ce groupe de souches avait été dûment validé par les travaux de référence et ceux plus actuels (Carmeille, Caranta, *et al.*, 2006; Carmeille, Prior, *et al.*, 2006; Lebeau, Daunay, *et al.*, 2010). Aussi, nous avons développé l'outil puce à ADN en exploitant la connaissance de l'ensemble des gènes (environ 11000 gènes) formant le pangénome des six souches séquencées chez *R. solanacearum*.

L'analyse approfondie du cluster de souches Brown rot sur la base de la technologie des puces à ADN a permis, pour la première fois, de caractériser effectivement une structure de population beaucoup plus complexe que celle connue (clonale), en particulier associée à des considérations de phylogéographie. Cette structure permet de reconstruire en outre les événements épidémiologiques et le passé évolutif de *R. solanacearum* en Europe (Cellier et coll. en préparation, chapitre 5). Les données présentées dans le cadre de ma thèse montrent d'abord un passé évolutif commun entre les souches de phylotypes IIB-2 et IIB-1 avec un rapprochement des souches d'origine andine par rapport au reste des souches. La seconde structure dévoilée fut la séparation nette entre les souches Brown rot IIB-1 appartenant à la zone géographique Africaine et Indo-Océanienne, et les souches européennes, présentant pour ces dernières un héritage génétique hybride, tantôt andin, tantôt africain. Ces résultats montrent bien la double situation épidémiologique des souches Brown rot en Europe. Ceci soulève des interrogations quant à la présence de souches IIB-1 au passé évolutif véritablement propre à une origine ancestrale Africaine dans l'écotype Brown rot et la présence de souches adaptées au froid dans le phylotype III, endémique de la même zone géographique. Par ailleurs, la tolérance au froid est partagée par la majorité des souches Brown rot quel que soit son clone ancestral, Andes ou Afrique, mais aussi dans le phylotype III dont la structure génomique apparaît d'héritabilité simple. Cette structure non hybride que nous associons volontiers à l'isolement géographique, signale un très faible remaniement génétique par échange de matériel entre différents groupes de souches, y compris avec les souches IIB-1 africaines (Cellier et coll. en préparation, chapitre 5). Ainsi, des études sont nécessaires pour compléter le raisonnement sur l'acquisition d'une tolérance au froid par les souches IIB-1, dont l'isolement géographique des écotypes africains a empêché l'échange d'information génétique sur leurs territoires avec l'écotype andin. Chez ces deux écotypes africains, cette structure génomique faiblement remaniée révèle un fort endémisme et renforce l'évidente nécessité de se pencher plus méthodiquement sur l'épidémiologie du flétrissement bactérien en Afrique et sur l'histoire évolutive de ces souches. De plus, nous remettons donc en question la dénomination

« Brown rot Africain » des souches de phylotype III (Mahbou Somo Toukam, 2010), puisqu'il apparaît que cela convient mieux aux souches de phylotype IIB-1 africaines. Les travaux présentés montrent la puissance de l'outil moléculaire que nous avons utilisé pour nous engager vers un processus fin de description des écotypes chez *R. solanacearum*.

La justification de développer une puce à ADN couvrant le pangénome a été d'autant plus stratégique que cela a permis de discerner les souches de sequevar 4 (Moko) du sequevar émergent 4NPB. Le sequevar 4 a d'ailleurs révélé une structure en deux groupes, dont l'un des groupes a montré un ou plusieurs événements de flux de gènes avec les souches émergentes. Néanmoins, ces intermédiaires évolutifs sont encore trop faibles en nombre ou bien n'ont pas encore été dévoilés dans la collection que nous avons établie. Nous les rechercherons de manière systématique, car porteur d'informations décisives pour mieux établir encore le passé évolutif des souches associé à leurs capacités à échanger du matériel génétique.

La pangénomique : Bentley

Les avancées des biotechnologies permettent désormais de formuler des hypothèses sur des domaines à la fois plus précis et plus large que les techniques phénotypiques ne nous permettaient pas autrefois. Les concepts développés ces dernières années sur la définition d'espèces sont désormais en train d'être revisités et complétés (Bentley, 2009), et *R. solanacearum* n'est pas une exception à cette règle (Remenant, Coupat-Goutaland, *et al.*, 2010). En effet, au vu des données de séquençage, les comparaisons de génomes justifient la refonte de la classification du complexe d'espèces *R. solanacearum* en trois espèces génomiques (Remenant et coll. en préparation), regroupant les souches de phylotype II dans l'espèce génomique *R. solanacearum*, où la souche type K60 est assignée au phylotype IIA-7 ; les souches de phylotypes I et III dans l'espèce génomique *R. sequeirae*, où la souche type GMI1000 est assignée au phylotype I-18 ; et les souches de phylotype IV dans l'espèce génomique *R. haywardii*. Nous tenterons de justifier la création de sous-espèces dans cette dernière espèce génomique : les souches de *R. solanacearum* de phylotype IV seraient renommées *R. haywardii* subspecies *solanacearum* dont PSI07 serait la souche type; les souches de BDB seraient renommées *R. haywardii* subspecies *celebensis* ; et les souches de *R. syzygii* seraient renommées *R. haywardii* subspecies *syzygii*.

L'énorme masse de données produite dans cette ère des « omics » permettra aussi de clarifier le statut des flux de gènes entre organismes et donnera lieu à de nouvelles nomenclatures, terminologies et définitions. C'est ainsi que pour parler du génome d'une espèce, l'on utilise désormais les notions de « pangénome » ou encore de « supragénome ». Cette montée en puissance est tributaire des capacités de traitement bio-informatique des

données. Ce domaine de développement est très actif depuis l'avènement des techniques de traitement haut débit. La terminologie n'est cependant pas encore entièrement établie pour l'étude du pangénome et certaines définitions demandent à être homogénéisées. Ainsi, alors que Hiller et coll. (2007) établissent un seuil pour les familles de protéines orthologues de 70% d'homologie pour un recouvrement de 70% de la longueur peptidique, Tettelin et coll. (2005) énoncent un minimum de 50% pour ces deux conditions. Ces deux seuils sont radicalement différents en termes de résultats et les interprétations pourront ainsi être différentes. Si l'on prend l'exemple de la définition du core génome, comme l'ensemble des gènes commun à une espèce donnée dont la séquence peut être variable, son interprétation avec ces deux seuils différents amène à deux résultats différents. Pour illustrer son propos, Bentley (2009) prend l'exemple des antigènes de surface et des transporteurs. Les antigènes de surface sont caractérisés par une forte variabilité de séquence, mais jouent cependant le même rôle en étant impliqués dans la reconnaissance immunitaire de l'hôte ; ils seront ainsi considérés comme appartenant à une famille d'orthologues ou non, en fonction du seuil considéré, impactant directement sur la fabrication de vaccins par exemple. Inversement, certains transporteurs ne présentent qu'une faible variation de leur séquence génique induisant un transport de substrat différent, soulevant la question de leur appartenance à une même famille d'orthologues. De ce fait, il ne sera pas surprenant de voir dans le futur le recours à des techniques d'annotation indépendantes plutôt basées sur les séquences d'ADN globales, que sur les séquences géniques codantes (CDS), et définiront le core et le pangénome (Bentley, 2009).

Le pangénome est l'angle de recherche avec lequel nous nous sommes engagés pour comprendre les mécanismes sous-jacents qui régissent les liens entre le modèle bactérien que nous étudions : *R. solanacearum* et ses hôtes. Cette approche vient compléter les précédents travaux sur l'analyse de la structuration des populations et sur les flux de gènes expliquant cette structuration (Guidot, Prior, et al., 2007). Le fastidieux travail de séquençage et d'annotation a été réalisé pour trois nouvelles souches de *R. solanacearum* (Remenant, Coupat-Goutaland, et al., 2010) permettant ainsi de couvrir la diversité connue dans les quatre phylotypes. Le séquençage des souches *R. syzygii* et le Blood Disease Bacterium (BDB) (Remenant et coll. en préparation) vont prochainement compléter ces connaissances dans le complexe d'espèces. Les travaux engagés dans cette partie ont été d'une importance capitale dans l'élaboration de la puce à ADN pangénomique visant, en premier lieu, la caractérisation des écotypes Brown rot et Moko, et en second lieu, la caractérisation du passé évolutif des souches du complexe d'espèces *R. solanacearum*.

Le discernement des complexes clonaux : Hall, Ehrlich, & Hu

À ce jour, 73 schémas MLST (multilocus sequence typing) couvrant 69 espèces différentes sont disponibles (<http://pubmlst.org/databases.shtml>), pour un total de 41 020 profils. Les épidémies qui sévissent sur les territoires sont causées par des clones de souches étroitement liées et qui partagent un ancêtre commun (Hall, Ehrlich, *et al.*, 2010). Ainsi, pour comprendre la dynamique de ces épidémies, il est indispensable d'estimer le degré de proximité phylogénétique entre ces souches. Les schémas MLST s'appuient sur le séquençage partiel d'un minimum de sept gènes de ménage et chaque séquence unique d'un locus est associée à un numéro d'allèle ; le profil allélique d'une souche est donc défini comme l'ensemble des numéros d'allèles pour cette souche. Ces schémas ont permis d'apprécier les nombreux transferts horizontaux de gènes intraespèce (Feil, Smith, *et al.*, 2000; Feil & Spratt, 2001; O'Rourke & Spratt, 1994). Cependant, il apparaît qu'il devient difficile de quantifier les mouvements de recombinaison entre les individus d'une même espèce et que nous manquons d'information concernant le seuil à partir duquel le taux de recombinaison influe sur le signal phylogénétique. Ainsi, il est communément accepté que pour tenir compte de la recombinaison, les analyses basées uniquement sur la phylogénie sont inadaptées pour estimer les relations entre isolats d'une même espèce. C'est pourquoi le schéma MSLT a été développé en relation avec une méthode agrégeant les individus les plus similaires. Néanmoins, la principale limitation de ces schémas est de ne tenir compte que d'une fraction infime du génome (0.1 - 0.2%). Il est ainsi fréquent de ne pas pouvoir différencier un groupe composé d'une multitude de souches, où le discernement se fait à un niveau de résolution plus fin. Il apparaît donc clair que les études basées sur les génomes complets et, *in fine*, sur le pangénome sont à même de révéler une plus grande diversité. De nombreuses études sont construites sur ce concept (Hiller, Janto, *et al.*, 2007; Hogg, Hu, *et al.*, 2007; Tettelin, Masignani, *et al.*, 2005). De ce fait, le core gène révélé par le pangénome permet de tester l'hypothèse de clonalité non plus sur des fragments de sept gènes, mais sur les séquences complètes de milliers de gènes. Il est aussi possible de connaître la répartition des gènes variables au sein de l'espèce et ainsi de caractériser les relations entre les souches. L'utilisation d'une puce à ADN s'avère particulièrement adaptée à ce genre d'analyse (Dobrindt & Hacker, 2001). Pour le moment, les schémas MLST sont moins coûteux en mettre en œuvre que les puces à ADN, mais les prix des puces à ADN sont en chute libre depuis quelques années et promettent une alternative puissante à l'exploration du vivant, compte tenu du degré de résolution sans commune mesure comparé aux meilleurs schémas MLSA/MLST produits à ce jour (Hall, Ehrlich, *et al.*, 2010).

2 La dynamique des génomes

L'étude de la dynamique du génome de *R. solanacearum* a révélé de nombreux mouvements de gènes dans les états ancestraux des phylotypes (Cellier et coll. en préparation, chapitre 5). Ces mouvements ont été caractérisés par des pertes, significativement plus fortes sur le mégaplasme que sur le chromosome, ainsi que par des gains significatifs, ici plus forts sur le chromosome. Ces résultats suggèrent que le mégaplasme apparaît plus flexible dans le contenu en gène que le chromosome, et les données expérimentales apportées soutiennent l'hypothèse d'une plus grande conservation du chromosome dans l'histoire évolutive de *R. solanacearum* (Remenant, Coupat-Goutaland, *et al.*, 2010; Salanoubat, Genin, *et al.*, 2002). La composition bipartite du génome de *R. solanacearum* a donc joué un rôle important dans son évolution, ce qui explique sans doute que cette architecture ait été conservée chez tous les *Ralstonia*, car elle pourrait contribuer à l'adaptation à de multiples niches écologiques tout en étant un gage de stabilité génomique. Les résultats de génomique comparative obtenus jusqu'à présent montrent bien l'importance des phénomènes d'acquisitions et de pertes de gènes pour l'évolution des organismes ; mais suggèrent aussi que l'organisation, et probablement la taille du génome, reflète le style de vie de l'organisme (Dobrindt & Hacker, 2001).

En parallèle, les données ont montré une forte propension aux mouvements des éléments génétiques mobiles, surtout caractérisés par des gains de ces gènes au cours de l'évolution de ce pathogène si « successful ».

Le mobilome : Pallen & Wren ; Brussow, Canchaya & Hardt

Le gain en gènes résultant de transferts horizontaux est la principale source d'innovation dans les génomes bactériens et peut être occasionné par de nombreux éléments génétiques mobiles, tels que les plasmides, les bactériophages, et organisé en îlots génomiques (Pallen & Wren, 2007). *R. solanacearum* est une bactérie naturellement compétente pour la transformation, c'est-à-dire pour l'acquisition de séquences d'ADN exogène (Bertolla & Simonet, 1999; Bertolla, Van Gijsegem, *et al.*, 1997; Coupat, Chaumeille-Dole, *et al.*, 2008; Guidot, Coupat, *et al.*, 2009). Les études de génomique montrent que les prophages ont un rôle d'importance majeure dans la diversification des bactéries phytopathogènes, notamment chez *E. coli*, *Streptococcus pyogenes* et *Staphylococcus aureus* (Brussow, Canchaya, *et al.*, 2004; Ohnishi, Kurokawa, *et al.*, 2001; Tobe, Beatson, *et al.*, 2006). En effet, il est avéré que certains prophages contiennent des séquences additionnelles de gènes non nécessaires pour la réplication, se situant généralement à une des extrémités de leur génome (Brussow, Canchaya, *et al.*, 2004). Ces compartiments sont appelés « morons », de par le fait que le génome de prophage associé encode plus d'ADN qu'il n'en est nécessaire

pour la réplication de l'ADN (Hendrix, Lawrence, *et al.*, 2000), et contiennent des gènes de conversion lysogénique. Nombreux sont ces gènes de conversion lysogénique qui encodent des facteurs de virulence avérés ou suspectés ; ils montrent par ailleurs un biais dans leurs compositions en bases nucléiques qui permettent de les différencier du reste du génome du phage et, *in extenso*, du génome bactérien (Pallen & Wren, 2007).

Ces compartiments sont donc associés à des changements de fitness du lysogène et se retrouvent ainsi potentiellement impliqués dans l'adaptation de pathogènes à de nouveaux hôtes et à l'émergence de nouveaux agents pathogènes ou clones épidémiques (Brussow, Canchaya, *et al.*, 2004). Un évènement similaire pourrait expliquer l'émergence des souches de phylotypes IIB-4NPB sur le territoire martiniquais et compléter les théories précédemment formulées à ce sujet (Wicker, Grassart, *et al.*, 2009). L'exemple le plus marquant dans l'histoire récente de l'humanité dans l'émergence de clones virulents est la peste, causée par *Yersinia pestis*, initialement pathogène de rongeurs et de puces et occasionnellement transmise à l'homme. Cette souche bactérienne est en effet, issue de l'évolution d'un pathogène gastro-intestinal, *Y. pseudotuberculosis*, par des processus d'acquisition, de perte et de réarrangement, en seulement 10 000 ans (Achtman, Morelli, *et al.*, 2004; Achtman, Zurth, *et al.*, 1999; Wren, 2003). Par comparaison, l'ancêtre commun entre *E. coli* et *S. enteritica* existe depuis plus de 140 millions d'années (Ochman & Wilson, 1987). De ce fait, il est intéressant de concevoir l'intégration du rôle des phages dans l'association plante-bactérie. Cependant, la conversion lysogénique est une des cinq différentes possibilités que possède un phage pour contribuer au changement de physiologie d'un organisme (Brussow, Canchaya, *et al.*, 2004). Le phage peut en effet (i) agir comme point chaud pour la recombinaison et le réarrangement du génome ; (ii) s'insérer dans la séquence génique et produire un pseudogène ; (iii) empêcher une nouvelle infection phagique ; (iv) lyser des cellules en compétition par l'induction de prophage ; et (v) par l'introduction de nouveaux facteurs physiologiques sélectifs (transduction et conversion lysogénique).

L'innovation apportée par le mobilome comme moteur d'évolution : Cohan

Les évènements de recombinaison sont aussi un moteur pour l'acquisition de nouveaux gènes et l'apport d'innovation au sein des génomes. Cependant, ces évènements de recombinaison sont rares chez les bactéries et les fragments d'ADN recombinés le sont à une fréquence équivalente à celle d'un évènement de mutation sur ce même fragment (Selander & Musser, 1990; Smith, Smith, *et al.*, 1993). Bien que les bactéries peuvent échanger du matériel génétique avec un « partenaire » possédant une divergence d'ADN allant jusqu'à 25%, (Duncan, Istock, *et al.*, 1989; Vulic, Dionisio, *et al.*, 1997), les principaux facteurs limitants sont : (i) le spectre d'hôte du vecteur dans le cadre d'une recombinaison médiée ;

(ii) les endonucléases (Milkman, Raleigh, *et al.*, 1999), sauf dans le cas d'une recombinaison par transformation (Cohan, Roberts, *et al.*, 1991) ; et (iii) la résistance de certains fragments à l'intégration (Rao, Chiu, *et al.*, 1995; Vulic, Dionisio, *et al.*, 1997). Les événements de recombinaison sont localisés sur une faible portion du génome et se limitent à des échanges de quelques centaines de bases nucléiques (Mckane & Milkman, 1995).

Cependant, *R. solanacearum* apparaît comme une exception à ces observations dans le monde bactérien. En effet, Coupat-Goutaland et coll. (2008) ont montré que la capacité à la transformation est une caractéristique ubiquiste dans le complexe d'espèces. Les événements de transformations ont été observés simultanément de multiples fois dans des régions distantes du génome, allant jusqu'à des transferts de fragments d'ADN contigu de 90 Kb. Ces résultats suggèrent que ces transformations ont pu jouer un rôle majeur dans l'évolution de *R. solanacearum*. Des études ont montré que les événements de recombinaison étaient principalement observés sur le chromosome (Smith, Dowson, *et al.*, 1991). La recombinaison bactérienne n'est cependant pas limitée au transfert homologue de séquence. L'intégration de nouveaux gènes d'autres organismes éloignés est en effet observable, par un échange des segments homologues flanqués de ces éléments hétérologues (Hamilton, Aldea, *et al.*, 1989; Majewski & Cohan, 1999). Alternativement, ces éléments peuvent être introduits par des éléments transposables (Van Spanning, Reijnders, *et al.*, 1995). Ainsi, certaines souches de *R. solanacearum* possèdent un opéron *rhi* conférant la possibilité de produire la rhizoxine. La rhizoxine est un composé antifongique antimitotique qui inhibe et dépolymérise la formation de microtubules chez les Eucaryotes (Takahashi, Kobayashi, *et al.*, 1989), conférant un avantage écologique aux organismes la produisant (Scherlach, Partida-Martinez, *et al.*, 2006). Cet opéron n'a été retrouvé que dans les souches de phylotype IIA, ainsi que dans les souches émergentes de phylotype IIB-4NPB et quelques souches de phylotype III (données non publiées) et IV. Cette distribution non ubiquiste suggère donc une acquisition horizontale par l'ancêtre des souches de phylotype IIA et par celui des souches émergentes de sequevar 4NPB. Des îlots génomiques sont aussi observables dans le génome de *R. solanacearum* (Remenant, Coupat-Goutaland, *et al.*, 2010; Salanoubat, Genin, *et al.*, 2002) et représentent des éléments génétiques importants, permettant d'apporter de l'innovation dans l'évolution des génomes. Ces îlots sont généralement non mobiles et il est avéré que leur évolution dans le génome bactérien a été influencée par les éléments génétiques mobiles (Dobrindt & Hacker, 2001). Ces îlots sont des acquisitions d'ADN exogènes pouvant contenir des éléments associés à la pathogénie, et sont alors appelés « îlots de pathogénie ».

« use it or lose it » : Pallen & Wren

Les données de génomique ont mis à l'épreuve la vision simpliste que les bactéries pathogènes émergent de bactéries non pathogènes par le biais d'acquisition de gènes de virulence sur un plasmide, de bactériophages ou d'îlot génomiques, et qu'elles peuvent, de ce fait, être caractérisées par la seule présence de ces facteurs de virulences (Pallen & Wren, 2007). La génomique a donc permis d'apporter une nouvelle vision de l'interaction hôte-agent pathogène, qui passe aussi par la perte de gènes progressive dans les génomes les plus adaptés à un hôte. Ainsi, le gain de nombreux gènes dans les branches ancestrales s'accompagne inéluctablement de pertes, sous peine de voir le génome de l'organisme croître de façon importante. La première conséquence d'un accroissement de la taille du génome est l'élargissement de la taille de la cellule, accompagné d'un retard dans la division et le développement cellulaire (Bennett, 1998; Petrov, 2001). De ce fait, il existe un équilibre entre le gain en gènes et leurs pertes (Mira, Ochman, *et al.*, 2001) et les gènes non maintenus par des pressions de sélection plus faibles sont perdus. Cette perte dans les génomes est parfois à mettre en relation avec le concept de « genome decay » (Andersson & Andersson, 1999; Wren, 2000), qui se définit par la perte importante, mais progressive, de gènes non nécessaires à la physiologie ou l'adaptation de l'organisme. Le parallèle peut être fait avec le génome du BDB dont la taille est inférieure de 500 Kb à la moyenne des souches de *R. solanacearum* (Remenant et coll. en préparation) et il s'agit d'un organisme phytopathogène notamment transmis par insecte (pas de manière spécifique) et strictement inféodé au bananier (Buddenhagen, 2009; Cellier & Prior, 2010; Gäumann, 1923). La réduction du génome du BDB est modérée, mais il est possible que l'on observe un intermédiaire évolutif vers un état optimisé du génome avec la perte de nombreux gènes non soumis à la sélection dans la niche écologique du BDB. Ainsi, les génomes des bactéries pathogènes sont en déclin sur le long terme, en accord avec leur restriction en tant qu'agent pathogène ou en tant qu'endosymbionte (Cerdano-Tarraga, Thomson, *et al.*, 2004; Moran, 2002). Le meilleur exemple de « genome decay » étant probablement celui de la mitochondrie humaine, organite qui appartenait ancestralement aux α -protéobactéries, dont le génome est de seulement 17 Kb (Anderson, Bankier, *et al.*, 1981). Une sélection positive visant la perte peut avoir lieu dans le génome d'un organisme. Il s'agit alors d'une perte bénéficiant à l'adaptation ou à la compétition face à d'autres organismes. Ainsi, chez les *Shigellae*, la perte du gène *cadA* entraîna l'arrêt de la production d'une enzyme, la lysine décarboxylase, dont le produit de métabolisme associé, la cadavérine, provoquait l'inhibition de l'expression de facteurs de virulence encodés sur un plasmide (Maurelli, 2007).

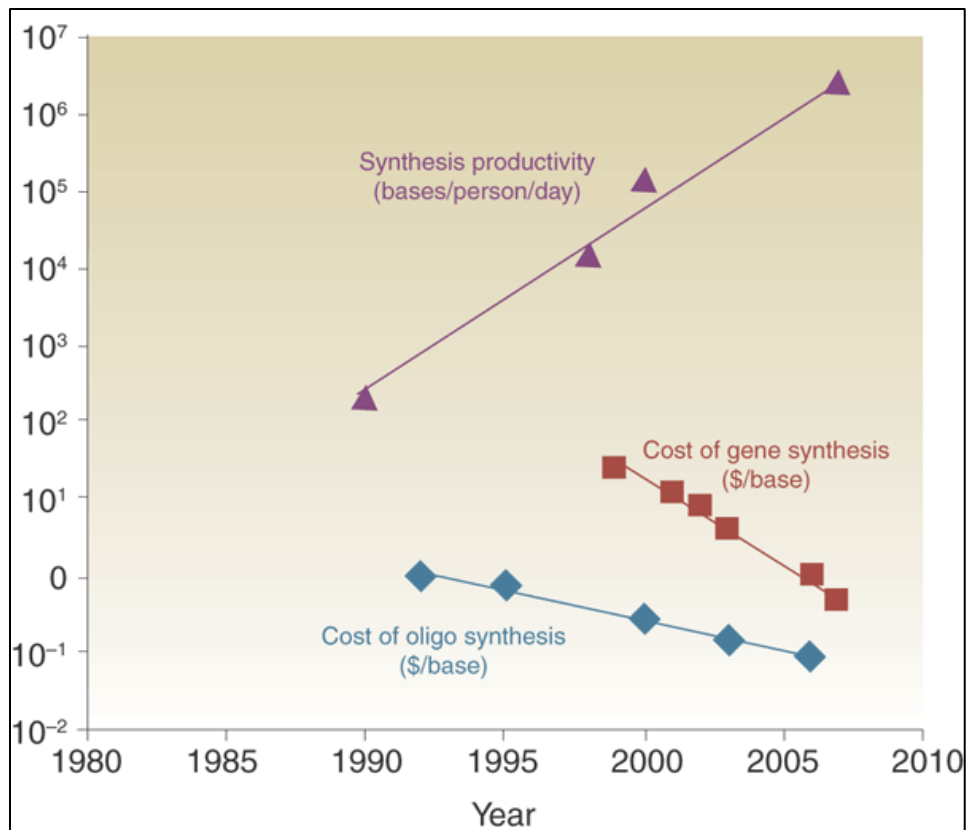


Figure 26. Synthèse d'oligonucléotide et de gènes : coût et productivité

Représentation d'après R. Carlson (2009) de la productivité de la synthèse de bases nucléotidiques par personne et par jour (violet), ainsi que du coût en dollar de la synthèse d'oligonucléotides (bleu) et de gènes (rouge) au fil des années.

L'insertion de séquence : Mira, Pushker, & Rodriguez-Valera

Alors que les génomes séquencés de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (da Silva, Ferro, *et al.*, 2002) et de *Pseudomonas syringae* (Buell, Joardar, *et al.*, 2003) révèlent une forte présence d'insertion de séquence (IS), il est rare de trouver ce type d'élément dans les génomes de *R. solanacearum*. Mira *et coll.* (2006) proposent un lien entre le nombre important d'IS dans le génome d'un organisme, avec une récente adaptation à un hôte (Parkhill, Wren, *et al.*, 2001) ou une restriction d'hôte (Moran & Plague, 2004). Il a été mis en relation la présence importante d'IS dans le génome de *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* (Lee, Park, *et al.*, 2005) avec la spécialisation pour les plants de riz (*Oryza sativa*) après leur expansion comme nourriture de première nécessité (Mira, Pushker, *et al.*, 2006). Ainsi, cette hypothèse soutient fortement le fait que *R. solanacearum* soit un pathogène ancestral pour lequel l'ouverture ou sa spécialisation sur un hôte s'est faite dans un état ancestral lointain. De nombreuses recherches sont encore nécessaires pour déterminer les mécanismes exacts qui ont fait évoluer *R. solanacearum* vers l'agent pathogène complexe que l'on connaît.

3 La biologie est-elle technologie ?

Les technologies de l'ADN ... aujourd'hui est déjà demain : Hudson

Nos connaissances de l'évolution des génomes et de l'écologie moléculaire sont en train de changer avec l'avènement des technologies basées sur le séquençage (Hudson, 2008). Les espèces et souches modèles ne seront plus les seules à bénéficier d'un séquençage complet et de nouvelles questions de recherche pourront émerger et ainsi compléter les connaissances de diversité écologique. La phylogénie sur les espèces modèles s'est basée sur l'analyse de gènes de ménages uniques ou d'un nombre limité (schéma MLST) et a permis de grandes avancées dans les domaines de recherche, notamment relatifs à la taxonomie, à l'étude des flux de gènes dans une population, ou encore le diagnostic. Cependant, ces méthodes se basent sur une caractérisation d'un événement biologique, d'un individu ou d'une population, par une étude d'un fragment de leur génome. Prendre en compte le génome dans sa globalité permet d'avoir une résolution plus fine et un raisonnement global pour un problème de recherche donné. La publication d'un génome séquencé et annoté trouve de multiples applications dans la compréhension de la biologie et de l'écologie d'une espèce : génomique comparative, puces à ADN, expression, études du contenu en gènes... On peut donc se poser la question de l'avenir des puces à ADN CGH au vu du prix en chute libre et de l'évolution rapide des techniques de séquençage. La courbe de Carlson, nommé d'après les travaux de Rob Carlson (2009), réfère la cinétique de diminution du coût par base du séquençage de l'ADN (Figure 26). Elle trouve son analogie dans la loi de Moore prédisant

l'augmentation systématique de la densité des transistors dans une puce informatique. Les courbes de Carlson prédisent ici l'évolution exponentielle des progrès dans le domaine du séquençage, sans aucun signe de ralentissement. Cette « loi » technologique semble pour l'instant être respectée avec une diminution des coûts d'une magnitude de l'ordre de 0,3 par année. Ainsi, la plupart des applications pour lesquelles la puce à ADN CGH est faite peuvent se faire par un séquençage massif de souches. Le principal obstacle en Europe est certainement le temps requis pour obtenir une séquence. Les délais sur le marché sont actuellement de l'ordre de l'année entre le dépôt de dossier et la disponibilité de la séquence, sauf dans le cadre d'un séquenceur à usage privé. Le développement de puces à ADN ou d'autres techniques moléculaires est actuellement plus rapide à mettre en œuvre, mais est-ce suffisant pour pérenniser cette technologie ?

Ce travail de thèse s'est voulu exhaustif sur la caractérisation à la fois phénotypique, génotypique et de l'évolution de l'agent phytopathogène tellurique *R. solanacearum* phylotype II. Il a permis de mettre en évidence de nombreuses facettes de cette diversité. Ce travail permet de poser de nouvelles bases chez *R. solanacearum* dans les domaines des nouvelles biotechnologies, notamment par l'exploitation du pangénome. La première décennie de génomique bactérienne a provoqué une progression sans précédent dans la caractérisation des organismes, en apportant de nouvelles perspectives significatives dans la connaissance scientifique de l'évolution de la virulence. Les prochaines décennies sont donc un présage d'avancées cruciales encore plus importantes dans la compréhension des mécanismes régissant l'évolution bactérienne et les interactions plante-pathogène.

4 *In fine*

La thèse que j'ai entreprise a permis une avancée significative des connaissances dans la caractérisation de l'agent pathogène *R. solanacearum*. Les disciplines majeures que sont la phylogénie, le phénotypage, la génomique comparative, la postgénomique et la dynamique évolutive ont été abordées au cours de ces trois années de recherche. Ces disciplines contribuent toutes à avancer dans une approche d'écologie moléculaire que l'on peut définir comme l'application de méthodes moléculaires basées sur l'exploration des particularités de l'ADN associé à l'étude de la diversité biologique (Moreira & Lopez-Garcia, 2002). Une vision de la microbiologie plus moderne est perceptible depuis l'avènement des technologies permettant l'étude moléculaire de l'écologie des organismes, et précisément ici, des procaryotes (Woese, 1987). Ainsi, appliquer de tels outils à notre modèle d'étude : l'exploration des souches de *R. solanacearum* unifiant le phylotype II, a permis de tirer un bilan le plus exhaustif possible des souches présentes en Europe. Clairement, la majorité des foyers de flétrissement bactérien ont été causés par l'écotype Brown rot du phylotype IIB-1.

Aucune souche africaine de phylotype III n'a pu être collectée, ni d'ailleurs de souches asiatiques de phylotype IV. Les souches que nous avons étudiées provenaient d'interception ou de foyer épidémiques et traduisaient donc une menace potentielle ou réelle pour l'agriculture. Ainsi, l'écotype Brown rot est majoritairement présent en Europe et les premiers résultats des tests de pathogénie nous ont conduits à décrire plusieurs pathotypes pour cet écotpe adapté à la pomme de terre, et conclure que les quatre phylotypes étaient composés de souches capables de flétrir cet hôte. Une large base génétique est donc partagée pour la virulence sur pomme de terre dans la phylogénie de *R. solanacearum*, non réservée à l'écotype Brown rot. La puce à ADN développée dans ces travaux, sur la base du séquençage de nouvelles souches de *R. solanacearum*, nous a permis de dévoiler la structure génomique et, dans une certaine mesure, le passé évolutif de l'écotype Brown rot en relation avec l'origine géographique des souches étudiées. Les applications de ces recherches vont s'orienter vers la production de marqueurs moléculaires spécifiques des différents groupes de souches afin de conforter à la fois l'approche épidémiologique et le diagnostic éclairé de cette phyto bactériose. Nos travaux ont aussi permis d'apprécier les différentes composantes de l'évolution de cet agent pathogène vers l'organisme modèle que nous connaissons actuellement : de nombreuses hypothèses sont formulées autour du gain et perte de gènes relatifs aux éléments mobiles, ainsi qu'à ceux liés à l'adaptation à l'environnement et à la pathogénie ; nous renseignant par la même occasion sur la part respective de chaque réplicon dans les mécanismes adaptatifs et évolutifs sources de diversité.

La description de cette diversité a été significativement améliorée par la puce à ADN pangénomique que nous avons développée, mais aussi par la stratégie de s'appuyer sur les données phylogénétiques les plus récentes associées aux traits phénotypiques marquants, pour le choix de souches retenues pour le séquençage des génomes que nous avons exploré dans le cadre de ma thèse. L'étude des souches de phylotype II devra être complétée en s'attachant à comprendre les mécanismes évolutifs associés à la différenciation des souches de sequevar 4 et 4NPB au sein même de l'écotype Moko. Des intermédiaires évolutifs devront être recherchés, car il est probable que leur étude permettra une résolution plus complète du passé évolutif chez *R. solanacearum*. Le deuxième écotpe étudié, l'écotype Brown rot, présente encore de nombreuses zones d'ombres quant au passé évolutif de ces souches, en relation avec la tolérance au froid : (i) comment expliquer cette propriété pour des souches africaines géographiquement isolées dont la structure génétique ne présente pas de flux de gènes avec le reste des souches du même écotpe ? (ii) Si cette acquisition est ancestrale, pourquoi ne la retrouve-t-on pas dans d'autres souches de phylotypes II, mais chez des souches de phylotype III ? Ces dernières méritent de ce fait une attention particulière et recoupent des caractéristiques d'endémisme qui offrent une opportunité

unique de compléter les connaissances sur l'évolution. Un projet est actuellement en train de se construire autour d'un séquençage massif de souches de *R. solanacearum* (entre 150 et 200) pour apporter entre autres, des éléments de réponse à ce type d'adaptation parasitaire.

Autant de données sur la dynamique du génome modèle *R. solanacearum* de phylotype II aboutiront certainement à des avancées majeures dans le domaine de l'écologie moléculaire. Il est donc envisageable d'appliquer cette même démarche de recherche pour caractériser les autres phylotypes, pour lesquels une grande partie de la diversité reste probablement à dévoiler. Le phylotype I par exemple est caractérisé par une large gamme d'hôtes est une distribution mondiale. Il témoigne d'une formidable diversité et la proximité génomique avec le phylotype III suggère une coévolution ancestrale de ces deux groupes.

Il serait aussi intéressant de dater la période d'émergence de l'organisme *R. solanacearum* et d'établir la relation avec l'apparition des plantes supérieures pour apprécier la vitesse évolutive de cet agent pathogène. La Pangée commence à se fracturer à la fin du Trias (~200 millions d'années) par un rift séparant l'actuelle Amérique du Nord de l'Afrique (Schenk, 1971). Ce rift a ouvert l'océan Atlantique nord et séparé la partie nord de la partie sud de la Pangée pour former deux nouveaux supercontinents : le Gondwana et la Laurasia. L'ouverture de cet océan a ramené l'humidité dans les régions arides et peu de temps après (~150-120 millions d'années), apparaissaient les gymnospermes (Anderson, Anderson, *et al.*, 1999), dont les ancêtres des hôtes de *R. solanacearum* que l'on connaît aujourd'hui. Il est hautement probable que *R. solanacearum*, pathogène ancestral, ait commencé à s'adapter dans ce contexte d'isolement géographique et botanique progressif ; d'ailleurs la classification par Cook et coll. (1989) des souches de *R. solanacearum* en deux Divisions va dans ce sens : l'une correspondant à des souches isolées dans le « Nouveau Monde » et l'autre dans l'« Ancien Monde ».

D'évidence, l'évolution des génomes bactériens est sous l'influence de leur environnement direct et donc de la niche écologique à laquelle chacun des organismes s'est adapté. Pour ce qui concerne la partie relevant du vivant pour niches écologiques, la spécialisation de ces organismes vers l'hôte a donc dû s'imposer progressivement. Ainsi, si l'on considère que l'évolution est un moteur de diversification, on aurait pu s'attendre à ce que la diversité soit plus grande chez les organismes pathogènes de plantes (cinq genres bactériens), que chez les agents pathogènes humains, du fait de l'apparition plus tardive de l'Homme par rapport aux végétaux. En fait il n'en est rien et on dénombre une quarantaine de genres bactériens pathogènes de l'Homme. Les mécanismes adaptatifs vers l'hôte sont donc aussi à considérer selon la diversité de l'hôte. Le genre *Ralstonia* regroupe par ailleurs, à la fois une majorité d'espèces environnementales, des espèces pathogènes de végétaux, d'animaux et de

l'Homme. Ainsi, trois espèces chez *Ralstonia* sont des germes cliniques : *mannitolytica* (De Baere, Steyaert, *et al.*, 2001), *pickettii* (Ralston, Palleroni, *et al.*, 1973) et *insidiosa* (Coenye, Goris, *et al.*, 2003).

Ainsi, étudier les mécanismes évolutifs associés au contenu en gène et à leur expression, dans un tel pathosystème modèle bactérie-plante, contribue certainement à renforcer les connaissances pour répondre à la question universelle de l'adaptation du vivant.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achtman, M., Morelli, G., Zhu, P. X., Wirth, T., Diehl, I., Kusecek, B., . . . Keim, P. (2004). Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(51), 17837-17842.
- Achtman, M., Zurth, K., Morelli, C., Torrea, G., Guiyoule, A., & Carniel, E. (1999). *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 14043-14048.
- Agindotan, B., & Perry, K. L. (2007). Macroarray detection of plant RNA viruses using randomly primed and amplified complementary DNAs from infected plants. *Phytopathology*, 97(1), 119-127.
- Aitman, T. J., Dong, R., Vyse, T. J., Norsworthy, P. J., Johnson, M. D., Smith, J., . . . Cook, H. T. (2006). Copy number polymorphism in *Fcgr3* predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature*, 439(7078), 851-855.
- Aittamaa, M., Somervuo, P., Pirhonen, M., Mattinen, L., Nissinen, R., Auvinen, P., & Valkonen, J. P. T. (2008). Distinguishing bacterial pathogens of potato using a genome-wide microarray approach. *Molecular Plant Pathology*, 9(5), 705-717.
- Akiew, E., & Trevorrow, P. R. (1994). Management of bacterial wilt of tobacco. In A. C. Hayward & G. L. Hartman (Eds.), *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (pp. 179-198). Wallingford, United Kingdom: CAB International.
- Aldon, D., Brito, B., Boucher, C., & Genin, S. (2000). A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal*, 19(10), 2304-2314.
- Alfano, J. R. (2009). Roadmap for future research on plant pathogen effectors. *Molecular Plant Pathology*, 10(6), 805-813.
- Alfano, J. R., & Collmer, A. (1996). Bacterial Pathogens in Plants: Life up against the Wall. *Plant Cell*, 8(10), 1683-1698.
- Alfano, J. R., & Collmer, A. (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 385-414.
- Allen, C., Kelman, A., & French, E. R. (2001). Brown rot. In W. R. Stevenson, R. Loria, G. D. Franc & D. P. Weingartner (Eds.), *Compendium of Potato Diseases* (Vol. 2nd, pp. 11-13). St. Paul, MN, U.S.A.: APS Press.
- Alvarez, A. (2005). Diversity and diagnosis of *Ralstonia solanacearum*. In C. Allen, P. Prior & A. C. Hayward (Eds.), *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex* (pp. 437-447). St Paul, MN: American Phytopathological Society (APS Press).
- Alvarez, B., Lopez, M. M., & Biosca, E. G. (2008). Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms. *Microbiology*, 154(Pt 11), 3590-3598.
- Alvarez, B., Vasse, J., Le-Courtois, V., Trigalet-Demery, D., Lopez, M. M., & Trigalet, A. (2008). Comparative behavior of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in diverse plant species. *Phytopathology*, 98(1), 59-68.

- Alves, E., Marucci, C. R., Lopes, J. R. S., & Leite, B. (2004). Leaf symptoms on plum, coffee and citrus and the relationship with the extent of xylem vessels colonized by *Xylella fastidiosa*. *Journal of Phytopathology*, 152, 291–297.
- Alwine, J. C., Kemp, D. J., & Stark, G. R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5350-5354.
- Anderson, J. M., Anderson, H. M., Archangelsky, S., Bamford, M., Chandra, S., Dettmann, M., . . . Rösler, O. (1999). Patterns of Gondwana plant colonisation and diversification. *Journal of African Earth Sciences*, 28(1), 145-167.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., Debruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., . . . Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the Human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457-465.
- Andersson, J. O., & Andersson, S. G. (1999). Insights into the evolutionary process of genome degradation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 9(6), 664-671.
- Atlung, T., & Ingmer, H. (1997). H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Molecular Microbiology*, 24(1), 7-17.
- Baharuddin, B., Rudolph, K., & Neipold, F. (1994). Production of monospecific antiserum against the blood disease bacterium affecting banana and plantain. *Phytopathology*, 84, 570-575.
- Baudoin, E., Benizri, E., & Guckert, A. (2002). Impact of growth stage on the bacteria community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Applied Soil Ecology*, 19, 135-145.
- Bellis, M., & Casellas, P. (1997). La puce ADN : un multi-réacteur de paillasse : Les nouveaux outils de l'analyse génétique et cytogénétique. *medecine sciences*, 13(11), 1317-1324.
- Bennett, C. P. A., Hunt, P., & Asman, A. (1985). Association of a xylem-limited bacterium with Sumatra disease of cloves in Indonesia. *Plant Pathology*, 34(4), 487-494.
- Bennett, M. D. (1998). Plant genome values: How much do we know? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), 2011-2016.
- Bentley, S. (2009). Sequencing the species pan-genome. *Nature Reviews Microbiology*, 7(4), 258-259.
- Béreau, M., & Messiaen, C. M. (1975). Réceptivité comparée des sols à l'infestation par *Pseudomonas solanacearum*. *Annales de Phytopathologie*, 7, 191-193.
- Beres, S. B., Carroll, R. K., Shea, P. R., Sitkiewicz, I., Martinez-Gutierrez, J. C., Low, D. E., . . . Musser, J. M. (2010). Molecular complexity of successive bacterial epidemics deconvoluted by comparative pathogenomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), 4371-4376.
- Berg, L. A. (1971). Weed hosts of *Pseudomonas solanacearum* (SFR strain) causing bacterial wilt of bananas. *Phytopathology*, 61(10), 1314-1315.
- Bertolla, F., Frostegard, A., Brito, B., Nesme, X., & Simonet, P. (1999). During infection of its host, the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* naturally develops a state of competence and exchanges genetic material. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(5), 467-472.
- Bertolla, F., & Simonet, P. (1999). Horizontal gene transfers in the environment: natural transformation as a putative process for gene transfers between transgenic plants and microorganisms. *Research in Microbiology*, 150(6), 375-384.
- Bertolla, F., Van Gijsegem, F., Nesme, X., & Simonet, P. (1997). Conditions for natural transformation of *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4965-4968.

- Bevivino, A., Tabacchioni, S., Chiarini, L., Carusi, M. V., Del Gallo, M., & Visca, P. (1994). Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. *Microbiology*, 140 (Pt 5), 1069-1077.
- Black, R., Seal, S., & Robinson-Smith, A. (1996). *Detection and identification of Pseudomonas solanacearum and other plant-pathogenic bacteria in less-developed countries*. Paper presented at the Diagnostics in Crop Protection: BCPC Symposium Proceedings No. 65, Farnham, UK.
- Boshou, L. (2005). A broad review and perspective on breeding for resistance to bacterial wilt. In C. Allen, P. Prior & A. C. Hayward (Eds.), *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex* (pp. 225-238). St Paul, MN: APS Press.
- Boucher, C. A. (1998). Pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* depends on hrp genes which govern the secretion of proteins mediating host/bacteria interactions. *EPPO Bulletin*, 28(1-2), 81-82.
- Brito, B., Aldon, D., Barberis, P., Boucher, C., & Genin, S. (2002). A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* hrp genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(2), 109-119.
- Brito, B., Marena, M., Barberis, P., Boucher, C., & Genin, S. (1999). prhJ and hrpG, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology*, 31(1), 237-251.
- Brumbley, S. M., Carney, B. F., & Denny, T. P. (1993). Phenotype conversion in *Pseudomonas solanacearum* due to spontaneous inactivation of *PhcA*, a putative *LysR* transcriptional regulator. *Journal of Bacteriology*, 175(17), 5477-5487.
- Brussow, H., Canchaya, C., & Hardt, W. D. (2004). Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 560-602.
- Buckley, D. H., & Schmidt, T. M. (2003). Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environmental Microbiology*, 5(6), 441-452.
- Buddenhagen, I. (2009). Blood Bacterial Wilt of Banana: History, Field Biology and Solution. *Acta Horticulturae*, 828, 57-68.
- Buddenhagen, I., & Kelman, A. (1964). Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 2, 203-230.
- Buddenhagen, I., Sequeira, L., & Kelman, A. (1962). Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 52, 726.
- Buddenhagen, I. W. (1986). *Bacterial wilt revisited*. Paper presented at the Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific: proceedings n°13 of an international workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines, 8-10 October 1985, Canberra, Australia.
- Buell, C. R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I. T., Gwinn, M. L., . . . Collmer, A. (2003). The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(18), 10181-10186.
- Büttner, D., & Bonas, U. (2002). Getting across - bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal*, 21(20), 5313-5322.
- Buyer, J. S., Roberts, D. P., & Russek-Cohen, E. (2002). Soil and plant effects on microbial community structure. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(11), 955-964.

- Call, D. R., Borucki, M. K., & Loge, F. J. (2003). Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays. *Journal of Microbiological Methods*, 53(2), 235-243.
- Carlson, R. (2009). The changing economics of DNA synthesis. *Nature Biotechnology*, 27(12), 1091-1094.
- Carmeille, A., Caranta, C., Dintinger, J., Prior, P., Luisetti, J., & Besse, P. (2006). Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo type II resistance in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 113(1), 110-121.
- Carmeille, A., Prior, P., Kodja, H., Chiroleu, F., Luisetti, J., & Besse, P. (2006). Evaluation of Resistance to Race 3, Biovar 2 of *Ralstonia solanacearum* in Tomato Germplasm. *Journal of Phytopathology*, 154, 398-402.
- Caruso, P., Bertolini, E., Cambra, M., & Lopez, M. M. (2003). A new and sensitive Co-operational polymerase chain reaction for rapid detection of *Ralstonia solanacearum* in water. *Journal of Microbiological Methods*, 55(1), 257-272.
- Caruso, P., Palomo, J. L., Bertolini, E., Alvarez, B., Lopez, M. M., & Biosca, E. G. (2005). Seasonal variation of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 populations in a Spanish river: Recovery of stressed cells at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 140-148.
- Cellier, G., & Prior, P. (2010). Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains pathogenic to potato. *Phytopathology*, 100(10), 1250-1261.
- Cerdeno-Tarraga, A., Thomson, N., & Parkhill, J. (2004). Pathogens in decay. *Nature Reviews Microbiology*, 2(10), 774-775.
- Chatterjee, S., Almeida, R. P., & Lindow, S. (2008). Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annual Review of Phytopathology*, 46, 243-271.
- Clough, S. J., Lee, K.-E., Schell, M. A., & Denny, T. P. (1997). A two-component system in *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* modulates production of PhcA-regulated virulence factors in response to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *Journal of Bacteriology*, 179, 3639-3648.
- Coenye, T., Goris, J., De Vos, P., Vandamme, P., & LiPuma, J. J. (2003). Classification of *Ralstonia pickettii*-like isolates from the environment and clinical samples as *Ralstonia insidiosa* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(4), 1075-1080.
- Coenye, T., & Vandamme, P. (2003). Simple sequence repeats and compositional bias in the bipartite *Ralstonia solanacearum* GM11000 genome. *BMC Genomics*, 4.
- Cohan, F. M. (1994). Genetic exchange and evolutionary divergence in prokaryotes. *Trends in Ecology & Evolution*, 9(5), 175-180.
- Cohan, F. M. (2001). Bacterial species and speciation. *Systematic Biology*, 50(4), 513-524.
- Cohan, F. M., Roberts, M. S., & King, E. C. (1991). The potential for genetic exchange by transformation within a natural population of *Bacillus subtilis*. *Evolution*, 45(6), 1393-1421.
- Community regime for the control of exports, transfer, brokering and transit of dual-use items, Council Regulation (EC) No 428/2009 C.F.R. (2009).
- Cook, D., Barlow, E., & Sequeira, L. (1989). Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment polymorphisms with DNA probes that specify virulence and hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2, 113-121.
- Cook, D., & Sequeira, L. (1991). Genetic and biochemical characterization of a *Pseudomonas solanacearum* gene cluster required for extracellular polysaccharide production and for virulence. *Journal of Bacteriology*, 173(5), 1654-1662.

- Cook, D., & Sequeira, L. (1994). Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In A. C. Hayward & G. L. Hartman (Eds.), *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (pp. 77-93). Wallingford, United Kingdom: CAB International.
- Coupat, B., Chaumeille-Dole, F., Fall, S., Prior, P., Simonet, P., Nesme, X., & Bertolla, F. (2008). Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and size of DNA that can be transferred. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(1), 14-24.
- Coutinho, T. A. (2005). Introduction and prospectus of the survival of *Ralstonia solanacearum*. In C. Allen, P. Prior & A. C. Hayward (Eds.), *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex* (pp. 29-38). St Paul, MN: APS Press.
- Cunnac, S., Occhialini, A., Barberis, P., Boucher, C., & Genin, S. (2004). Inventory and functional analysis of the large *Hrp* regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. *Molecular Microbiology*, 53(1), 115-128.
- Curtis, T. P., & Sloan, W. T. (2004). Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Current Opinion in Microbiology*, 7(3), 221-226.
- da Silva, A. C. R., Ferro, J. A., Reinach, F. C., Farah, C. S., Furlan, L. R., Quaggio, R. B., . . . Kitajima, J. P. (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, 417(6887), 459-463.
- De Baere, T., Steyaert, S., Wauters, G., De Vos, P., Goris, J., Coenye, T., . . . Vaneechoutte, M. (2001). Classification of *Ralstonia pickettii* biovar 3/'thomasi' strains (Pickett 1994) and of new isolates related to nosocomial recurrent meningitis as *Ralstonia mannitolytica* sp nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 547-558.
- Delafield, F. P., Doudoroff, M., Palleroni, N. J., Lusty, C. J., & Contopoulou, R. (1965). Decomposition of poly-beta-hydroxybutyrate by Pseudomonads. *Journal of Bacteriology*, 90(5), 1455-1466.
- Delaspre, F., Nieto Penalver, C. G., Saurel, O., Kiefer, P., Gras, E., Milon, A., . . . Vorholt, J. A. (2007). The *Ralstonia solanacearum* pathogenicity regulator HrpB induces 3-hydroxy-oxindole synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(40), 15870-15875.
- Denny, T. (2006). Plant pathogenic *Ralstonia* species. In S. S. Gnanamanickam (Ed.), *Plant-Associated Bacteria* (pp. 573-644). Dordrecht, The Netherlands: Springer Netherlands.
- Denny, T. P., & Baek, S. R. (1991). Genetic evidence that extracellular polysaccharide is a virulence factor of *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4, 198-206.
- Denny, T. P., Brumbley, S. M., Carney, B. F., Clough, S. J., & Schell, M. (1994). Phenotype conversion of *Pseudomonas solanacearum*: its molecular basis and potential function. In A. C. Hayward & G. L. Hartman (Eds.), *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (pp. 137-144). Wallingford: CAB International.
- Denny, T. P., Carney, B. F., & Schell, M. A. (1990). Inactivation of multiple virulence genes reduces the ability of *Pseudomonas Solanacearum* to cause wilt symptoms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 3(5), 293-300.
- Denny, T. P., Cowart, T., & Morrison, C. (2006). *Genetic basis of the Ralstonia solanacearum biovar assay*. Paper presented at the The 4th International Bacterial Wilt Symposium, York, United Kingdom.
- DeRisi, J. L., Iyer, V. R., & Brown, P. O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 278(5338), 680-686.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D. X., Khounlotham, M., Boucher, C., . . . Marco, Y. (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III

- effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13), 8024-8029.
- Dittapongpitch, V., & Surat, S. (2003). Detection of *Ralstonia solanacearum* in soil and weeds from commercial tomato fields using immunocapture and the polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology*, 151(4), 239-246.
- Dobrindt, U., & Hacker, J. (2001). Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 4(5), 550-557.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., & Hacker, J. (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 2(5), 414-424.
- Doidge, E. M. (1914). Some diseases of the potato. *Union of South Africa Agricultural Journal*, 7, 6.
- Doktycz, M. J., Morris, M. D., Dormady, S. J., Beattie, K. L., & Jacobson, K. B. (1995). Optical melting of 128 octamer DNA duplexes. Effects of base pair location and nearest neighbors on thermal stability. *Journal of Biological Chemistry*, 270(15), 8439-8445.
- Doudoroff, M., & Stanier, R. Y. (1959). Role of poly-beta-hydroxybutyric acid in the assimilation of organic carbon by bacteria. *Nature*, 183(4673), 1440-1442.
- Dubey, S. K., Tripathi, A. K., & Upadhyay, S. N. (2005). Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource. *Bioresource Technology*, 97(17), 2217-2224.
- Duncan, K. E., Istock, C. A., Graham, J. B., & Ferguson, N. (1989). Genetic exchange between *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*: Variable hybrid stability and the nature of bacterial species. *Evolution*, 43(8), 1585-1609.
- Echandi, E. (1991). Root diseases caused by bacteria: bacterial wilt. In H. D. Shew & G. B. Lucas (Eds.), *Compendium of Tobacco Diseases* (pp. 33-35). St Paul, MN, U.S.A.: APS Press.
- Eden-Green, S. J. (1994). Diversity of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria in South East Asia: new direction for moko disease. In A. C. Hayward & G. L. Hartman (Eds.), *Bacterial wilt: the disease and its causative organism, Pseudomonas solanacearum* (pp. 25-34). Wallingford, United Kingdom: CAB International.
- Eden-Green, S. J., & Adhi, E. M. (1986). Sumatra disease of cloves and *Pseudomonas solanacearum*. *Bacterial Wilt Newsletter*, 1, 2-3.
- Eden-Green, S. J., Balfas, R., & Sutarjo, T. (1992). Characteristics of transmission of Sumatra disease of cloves by tube-building cercopoids, *Hindola* spp. *Plant Pathology*, 41, 702-712.
- Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H. A., & Caskey, C. T. (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics*, 49(4), 746-756.
- Eisen, J. A. (2000). Horizontal gene transfer among microbial genomes: new insights from complete genome analysis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10(6), 606-611.
- Elliott, G. N., Chen, W. M., Chou, J. H., Wang, H. C., Sheu, S. Y., Perin, L., . . . James, E. K. (2007). *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. *New Phytologist*, 173(1), 168-180.
- Elphinstone, J. (1998). Survival and transmission of *Ralstonia solanacearum* in aquatic plants of *Solanum dulcamara* and associated surface water in England. *Bulletin OEPP*, 28(1-2), 85-92.
- Elphinstone, J. G. (1996). Survival and possibilities for extinction of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) in cool climates. *Potato Research*, 39(3), 403-410.

- Elphinstone, J. G. (2005). The current bacterial wilt situation: A global overview. In C. Allen, P. Prior & A. C. Hayward (Eds.), *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex* (pp. 9-28). St Paul, MN: APS Press.
- Elphinstone, J. G., & Stanford, H. (1998). Sensitivity of methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers. *EPPO Bulletin*, 28(1-2), 69-70.
- Elphinstone, J. G., Stead, D. E., Caffier, D., Janse, J. D., López, M. M., Mazzucchi, U., . . . Van Vaerenbergh, J. (2000). Standardization of methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato. *EPPO Bulletin*, 30, 391-395.
- Enfinger, J. M., McCarter, S. M., & Jaworski, C. A. (1979). Evaluation of chemicals and application methods for control of bacterial wilt of tomato transplants. *Phytopathology*, 69(6), 637-340.
- Englebrecht, M. C. (1994). Modification of a selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. *ACIAR Bacterial Wilt Newsletter*, 10, 3-5.
- Fegan, M. (2005). Bacterial wilt disease of Banana: evolution and ecology. In C. Allen, P. Prior & A. C. Hayward (Eds.), *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex* (pp. 379-386). St Paul, MN: APS Press.
- Fegan, M., & Prior, P. (2005). How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex". In C. Allen, P. Prior & A. C. Hayward (Eds.), *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex* (pp. 449-461). St Paul, MN: APS Press.
- Feil, E. J., Smith, J. M., Enright, M. C., & Spratt, B. G. (2000). Estimating recombinational parameters in *Streptococcus pneumoniae* from multilocus sequence typing data. *Genetics*, 154(4), 1439-1450.
- Feil, E. J., & Spratt, B. G. (2001). Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annual Review of Microbiology*, 55, 561-590.
- Fellermann, K., Stange, D. E., Schaeffeler, E., Schmalzl, H., Wehkamp, J., Bevins, C. L., . . . Stange, E. F. (2006). A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *American Journal of Human Genetics*, 79(3), 439-448.
- Flavier, A. B., Clough, S. J., Schell, M. A., & Denny, T. P. (1997). Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology*, 26(2), 251-259.
- Fortnum, B. A., & Kluepfel, D. (2005). Mechanization has contributed to the spread of bacterial wilt on flue-cured tobacco in the Southeastern USA. In C. Allen, P. Prior & A. C. Hayward (Eds.), *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex* (pp. 51-59). St Paul, MN: American Phytopathological Society (APS Press).
- Fotin, A. V., Drobyshev, A. L., Proudnikov, D. Y., Perov, A. N., & Mirzabekov, A. D. (1998). Parallel thermodynamic analysis of duplexes on oligodeoxyribonucleotide microchips. *Nucleic Acids Research*, 26(6), 1515-1521.
- Foxman, B., Zhang, L., Koopman, J. S., Manning, S. D., & Marrs, C. F. (2005). Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiologic Perspectives & Innovations*, 2, 10.
- French, E. R. (1986). *Interaction between strains of Pseudomonas solanacearum, its hosts and the environment*. Paper presented at the Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific: proceedings n°13 of an international workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines, 8-10 October 1985, Canberra, Australia.
- French, E. R. (1994). Strategies for integrated control of bacterial wilt of potatoes. In A. C. Hayward & G. L. Hartman (Eds.), *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (pp. 199-207). Wallingford, United Kingdom: CAB International.

- French, E. R., Aley, P., Torres, E., & Nydegger, U. (1993). *Diversity of Pseudomonas solanacearum in Peru and Brazil*. Paper presented at the Bacterial Wilt. ACIAR Proceedings No. 45, Canberra, Australia.
- French, E. R., & Sequeira, L. (1970). Strains of *Pseudomonas solanacearum* from Central and South America: a comparative study. *Phytopathology*, 60(3), 506-512.
- Gabriel, D. W., Allen, C., Schell, M., Denny, T. P., Greenberg, J. T., Duan, Y. P., . . . Mikhailova, N. (2006). Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(1), 69-79.
- Garbeva, J., Van Veen, J. A., & Van Elsas, J. D. (2004). Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 243-270.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 2). Baltimore: Originally published by Williams & Wilkins, 1984.
- Gäumann, E. (1921). Onderzoekingen over de bloedziekte der bananen op Celebes I. *Mededelingen van het Instituut voor Plantenziekten*, 50, 47.
- Gäumann, E. (1923). Onderzoekingen over de bloedziekte der bananen op Celebes II. *Mededelingen van het Instituut voor Plantenziekten*, 59, 45.
- Gehrig, H., Schussler, A., & Kluge, M. (1996). Geosiphon pyriforme, a fungus forming endocytobiosis with Nostoc (Cyanobacteria), is an ancestral member of the Glomales: Evidence by SSU rRNA analysis. *Journal of Molecular Evolution*, 43(1), 71-81.
- Genin, S., & Boucher, C. (2004). Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 42(1), 107-134.
- Gillings, M., & Fahy, P. (1993). Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum* biovars 2 and N2 assessed using restriction endonuclease analysis of total genomic DNA. *Plant Pathology*, 42, 744-753.
- Gillings, M., Fahy, P., & Davies, C. (1993). Restriction analysis of an amplified polygalacturonase gene fragment differentiates strains of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas solanacearum*. *Letters in Applied Microbiology*, 17, 44-48.
- Gillings, M. R., & Fahy, P. (1994). Genomic Fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. In A. C. Hayward & G. L. Hartman (Eds.), *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (pp. 95-112). Wallingford, United Kingdom: CAB International.
- Glick, D. L., Coffey, C. M., & Sulzinski, M. A. (2002). Simultaneous PCR Detection of the Two Major Bacterial Pathogens of Geranium. *Journal of Phytopathology*, 150(2), 54-59.
- Gonzalez, E., Kulkarni, H., Bolivar, H., Mangano, A., Sanchez, R., Catano, G., . . . Ahuja, S. K. (2005). The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science*, 307(5714), 1434-1440.
- Gonzalez, E. T., & Allen, C. (2003). Characterization of a *Ralstonia solanacearum* operon required for polygalacturonate degradation and uptake of galacturonic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(6), 536-544.
- Goodfellow, M., Manfio, G. P., & Chun, J. (1997). Towards a practical species concept for cultivable bacteria. In M. F. Claridge, H. A. Dawah & M. R. Wilson (Eds.), *Species: The units of biodiversity* (pp. 25-59). London: Chapman & Hall.

- Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., & Tiedje, J. M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(Pt 1), 81-91.
- Gorissen, A., van Overbeek, L. S., & van Elsas, J. D. (2004). Pig slurry reduces the survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(8), 587-593.
- Graham, J., & Lloyd, A. B. (1978). An improved indicator plant method for the detection of *Pseudomonas solanacearum* race 3 in soil. *Plant Disease Reporter*, 62, 35-37.
- Granada, G., & Sequeira, L. (1975). A Hypersensitive Reaction Induced in Tobacco Leaves by a Compatible (Race 1) Isolate of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 65, 731-733.
- Grey, B. E., & Steck, T. R. (2001). The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 3866-3872.
- Griep, R. A., van Twisk, C., van Beckhoven, J. R. C. M., van der Wolf, J. M., & Schots, A. (1998). Development of specific recombinant monoclonal antibodies against the lipopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* race 3. *Phytopathology*, 88(8), 795-803.
- Griffin, T. J., & Smith, L. M. (1998). An approach to predicting the stabilities of peptide nucleic acid:DNA duplexes. *Analytical Biochemistry*, 260(1), 56-63.
- Grimault, V., Anais, G., & Prior, P. (1994). Distribution of *Pseudomonas solanacearum* in the stem tissues of tomato plants with different levels of resistance to bacterial wilt. *Plant Pathology*, 43(4), 663-668.
- Grimault, V., Gelie, B., Lemattre, M., Prior, P., & Schmit, J. (1994). Comparative histology of resistant and susceptible tomato cultivars infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 44(2), 105-123.
- Grimault, V., & Prior, P. (1994). Grafting Tomato Cultivars Resistant or Susceptible to Bacterial Wilt - Analysis of Resistance Mechanisms. *Journal of Phytopathology*, 141(3), 330-334.
- Grimont, P. A. (1988). Use of DNA reassociation in bacterial classification. *Canadian Journal of Microbiology*, 34(4), 541-546.
- Guidot, A., Coupat, B., Fall, S., Prior, P., & Bertolla, F. (2009). Horizontal gene transfer between *Ralstonia solanacearum* strains detected by comparative genomic hybridization on microarrays. *The ISME Journal*, 3(5), 549-562.
- Guidot, A., Elbaz, M., Carrere, S., Siri, M. I., Pianzola, M. J., Prior, P., & Boucher, C. (2009). Specific genes from the potato brown rot strains of *Ralstonia solanacearum* and their potential use for strain detection. *Phytopathology*, 99(9), 1105-1112.
- Guidot, A., Prior, P., Schoenfeld, J., Carrere, S., Genin, S., & Boucher, C. (2007). Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *Journal of Bacteriology*, 189(2), 377-387.
- Hall, B. G., Ehrlich, G. D., & Hu, F. Z. (2010). Pan-genome analysis provides much higher strain typing resolution than multi-locus sequence typing. *Microbiology*, 156(Pt 4), 1060-1068.
- Hamilton, C. M., Aldea, M., Washburn, B. K., Babitzke, P., & Kushner, S. R. (1989). New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 171(9), 4617-4622.
- Handrick, R., Reinhardt, S., & Jendrossek, D. (2000). Mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Bacteriology*, 182(20), 5916-5918.

- Hartman, G. L., & Elphinstone, J. G. (1994). Advances in the control of *Pseudomonas solanacearum* race 1 in major food crops. In A. C. Hayward & G. L. Hartman (Eds.), *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (pp. 157-177). Wallingford, United Kingdom: CAB International.
- Hartung, F., Werner, R., Mühlbach, H.-P., & Büttner, C. (1998). Highly specific PCR-diagnosis to determine *Pseudomonas solanacearum* strains of different geographical origins. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(6-7), 797-802.
- Hayward, A. C. (1964). Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology*, 27(2), 265-277.
- Hayward, A. C. (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 29, 67-87.
- Hayward, A. C. (1994a). The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In A. C. Hayward & G. L. Hartman (Eds.), *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (pp. 9-24). Wallingford: CAB International.
- Hayward, A. C. (1994b). Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In A. C. Hayward & G. L. Hartman (Eds.), *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (pp. 123-135). Wallingford: CAB International.
- Hayward, A. C. (2000). *Ralstonia solanacearum*. In J. Lederberg (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology* (Vol. 4, pp. 32-42). San Diego, CA: Academic Press.
- Hayward, A. C., El-Nashaar, H. M., Nydegger, U., & De Lindo, L. (1990). Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 269-280.
- He, L. Y., Sequeira, L., & Kelman, A. (1983). Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Disease*, 67, 1357-1361.
- He, S. Y., Nomura, K., & Whittam, T. S. (2004). Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1694(1-3), 181-206.
- Hendrix, R. W., Lawrence, J. G., Hatfull, G. F., & Casjens, S. (2000). The origins and ongoing evolution of viruses. *Trends in Microbiology*, 8(11), 504-508.
- Henikoff, S., Haughn, G. W., Calvo, J. M., & Wallace, J. C. (1988). A large family of bacterial activator proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(18), 6602-6606.
- Hentschel, U., Steinert, M., & Hacker, J. (2000). Common molecular mechanisms of symbiosis and pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 8(5), 226-231.
- Hiller, N. L., Janto, B., Hogg, J. S., Boissy, R., Yu, S. S., Powell, E., . . . Hu, F. Z. (2007). Comparative genomic analyses of seventeen *Streptococcus pneumoniae* strains: Insights into the pneumococcal supragenome. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 8186-8195.
- Hiraishi, A. (1994). Phylogenetic affiliations of *Rhodospirillum rubrum* and related species of phototrophic bacteria as determined by automated 16S rDNA sequencing. *Current Microbiology*, 28(1), 25-29.
- Hogg, J. S., Hu, F. Z., Janto, B., Boissy, R., Hayes, J., Keefe, R., . . . Ehrlich, G. D. (2007). Characterization and modeling of the *Haemophilus influenzae* core and supragenomes based on the complete genomic sequences of Rd and 12 clinical nontypeable strains. *Genome Biology*, 8(6), R103.
- Holloway, A. J., van Laar, R. K., Tothill, R. W., & Bowtell, D. D. (2002). Options available - from start to finish - for obtaining data from DNA microarrays II. *Nature Genetics*, 32 Suppl, 481-489.
- Hopkins, D. L. (1989). *Xylella fastidiosa*—xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annual Review of Phytopathology*, 27, 271-290.

- Horita, M., & Tsuchiya, K. (2001). Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology*, 91(4), 399-407.
- Huang, J., Carney, B. F., Denny, T. P., Weissinger, A. K., & Schell, M. A. (1995). A complex network regulates expression of *eps* and other virulence genes of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, 177, 1259-1267.
- Huang, J., Denny, T. P., & Schell, M. A. (1993). *VsrB*, a regulator of virulence genes of *Pseudomonas solanacearum*, is homologous to sensors of the two-component regulator family. *Journal of Bacteriology*, 175, 6169-6178.
- Huang, J., & Schell, M. A. (1992). Role of the two-component leader sequence and mature amino acid sequences in extracellular export of endoglucanase *egl* from *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, 174, 1314-1323.
- Huang, Q., & Allen, C. (2000). Polygalacturonases are required for rapid colonisation and full virulence of *Ralstonia solanacearum* on tomato plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57, 77-83.
- Hudson, M. E. (2008). Sequencing breakthroughs for genomic ecology and evolutionary biology. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 3-17.
- Hughes, T. R., Mao, M., Jones, A. R., Burchard, J., Marton, M. J., Shannon, K. W., . . . Linsley, P. S. (2001). Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nature Biotechnology*, 19(4), 342-347.
- Hussain, A., & Kelman, A. (1958). Relation of slime production to mechanism of wilting and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 48, 155-165.
- Janse, J. D. (1988). A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *EPPO Bulletin*, 18(3), 343-351.
- Janse, J. D. (1991). Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains, using whole cell fatty acid analysis. *Systematic and Applied Microbiology*, 14, 335-345.
- Janse, J. D. (1996). Potato brown rot in western Europe - history, present occurrence and some remarks on possible origin. *EPPO Bulletin*, 26(3-4), 17.
- Janse, J. D., Araluppan, F. A. X., Schans, J., Wenneker, M., & Westerhuis, W. (1998). Experiences with bacterial brown rot, *Ralstonia solanacearum* biovar 2 race 3, in the Netherlands. In P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone (Eds.), *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects* (pp. 146-154). Paris, France: INRA Editions.
- Janse, J. D., van den Beld, H. E., Elphinstone, J., Simpkins, S., Tjou-Tam-Sin, N. N. A., & van Vaerenbergh, J. (2004). Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. *Journal of Plant Pathology*, 86(2), 147-155.
- Jeong, E. L., & Timmis, J. N. (2000). Novel insertion sequence elements associated with genetic heterogeneity and phenotype conversion in *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, 182(16), 4673-4676.
- Jeong, Y., Kim, J., Kang, Y., Lee, S., & Hwang, I. (2007). Genetic diversity and distribution of Korean isolates of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Disease*, 91(10), 1277-1287.
- Johnson, J. L. (1973). Use of nucleic-acid homologies in the taxonomy of anaerobic bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23(4), 308-315.
- Kane, M. D., Jatko, T. A., Stumpf, C. R., Lu, J., Thomas, J. D., & Madore, S. J. (2000). Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Research*, 28(22), 4552-4557.

- Kang, Y., Liu, H., Carlson, R. W., & Denny, T. P. (2004). Lipopolysacchride O-antigen of *Ralstonia solanacearum* contributes to virulence on tomato plants. *Phytopathology*, 94(S49).
- Kang, Y. W., Liu, H. L., Genin, S., Schell, M. A., & Denny, T. P. (2002). *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Molecular Microbiology*, 46(2), 427-437.
- Kao, C. C., & Sequeira, L. (1991). A gene cluster required for coordinated biosynthesis of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide also affects virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, 173(24), 7841-7847.
- Keen, N. T. (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Genetics*, 24, 447-463.
- Kelman, A. (1953). The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *North Carolina Agricultural Experiment Station, Technical Bulletin No. 99*.
- Kelman, A. (1954). The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology*, 44, 693-695.
- Kelman, A., & Person, L. H. (1961). Strains of *Pseudomonas solanacearum* differing in pathogenicity to tobacco and peanut. *Phytopathology*, 51, 158-161.
- Kiers, E. T., & Denison, R. F. (2008). Sanctions, cooperation, and the stability of plant-rhizosphere mutualisms. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 39(1), 215-236.
- Killiny, N., & Almeida, R. P. (2009). *Xylella fastidiosa* afimbrial adhesins mediate cell transmission to plants by leafhopper vectors. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(2), 521-528.
- Klappenbach, J. A., Dunbar, J. M., & Schmidt, T. M. (2000). rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1328-1333.
- Klement, Z. (1982). Hypersensitivity. In M. S. Mount & G. H. Lacy (Eds.), *Phytopathogenic Prokaryotes*. New York, U.S.A.: Academic Press.
- Kluepfel, D. A. (1993). The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. *Annual Review of Phytopathology*, 31, 441-472.
- Koeppel, A., Perry, E. B., Sikorski, J., Krizanc, D., Warner, A., Ward, D. M., . . . Cohan, F. M. (2008). Identifying the fundamental units of bacterial diversity: a paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), 2504-2509.
- Konstantinidis, K. T., & Tiedje, J. M. (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(7), 2567-2572.
- Kubota, R., Vine, B. G., Alvarez, A. M., & Jenkins, D. M. (2008). Detection of *Ralstonia solanacearum* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathology*, 98(9), 1045-1051.
- Kumar, A., Sarma, Y. R., & Anandaraj, M. (2004). Evaluation of genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt of ginger using REP-PCR and PCR-RFLP. *Current Science (Bangalore)*, 87(11), 1555-1561.
- Kunitsyn, A., Kochetkova, S., Timofeev, E., & Florentiev, V. (1996). Partial thermodynamic parameters for prediction stability and washing behavior of DNA duplexes immobilized on gel matrix. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 14(2), 239-244.

- Kutin, R. K., Alvarez, A., & Jenkins, D. M. (2009). Detection of *Ralstonia solanacearum* in natural substrates using phage amplification integrated with real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*, 76(3), 241-246.
- Agricultural Bioterrorism Protection Act of 2002; Possession, Use, and Transfer of Biological Agents and Toxins; Interim Final Rule, 7 CFR Part 331; 9 CFR Part 121 C.F.R. (2002).
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., . . . Chen, Y. J. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860-921.
- Lavie, M., Seunes, B., Prior, P., & Boucher, C. (2004). Distribution and sequence analysis of a family of type III-dependent effectors correlate with the phylogeny of *Ralstonia solanacearum* strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(8), 931-940.
- Lebeau, A., Daunay, M. C., Frary, A., Palloix, A., Wang, J. F., Dintinger, J., . . . Prior, P. (2010). Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology*.
- Lee, B. M., Park, Y. J., Park, D. S., Kang, H. W., Kim, J. G., Song, E. S., . . . Go, S. J. (2005). The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nucleic Acids Research*, 33(2), 577-586.
- Lee, Y.-A., & Wang, C. C. (2000). The design of specific primers for the detection of *Ralstonia solanacearum* in soil samples by polymerase chain reaction. *Botanical Bulletin of Academia Sinica (Taipei)*, 41, 8.
- Lemaga, B., Kakuhenzire, R., Kassa, B., Ewell, P. T., & Priou, S. (2005). Interated control of potato bacterial wilt in eastern Africa: the experience of African Highlands Initiative. In C. Allen, P. Prior & A. C. Hayward (Eds.), *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex* (pp. 145-157). St Paul, MN: APS Press.
- Levy, S., Sutton, G., Ng, P. C., Feuk, L., Halpern, A. L., Walenz, B. P., . . . Venter, J. C. (2007). The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biology*, 5(10), e254.
- Li, X., Dorsch, M., Del Dot, T., Sly, L. I., Stakebrandt, E., & Hayward, A. C. (1993). *Phylogeny of biovars of Pseudomonas solanacearum based on sequencing of 16S rRNA*. Paper presented at the Bacterial Wilt: ACIAR Proceedings No. 45, Canberra, Australia.
- Liolios, K., Chen, I. M., Mavromatis, K., Tavernarakis, N., Hugenholtz, P., Markowitz, V. M., & Kyrpides, N. C. (2010). The Genomes On Line Database (GOLD) in 2009: status of genomic and metagenomic projects and their associated metadata. *Nucleic Acids Research*, 38(Database issue), D346-354.
- Lipshutz, R. J., Fodor, S. P., Gingeras, T. R., & Lockhart, D. J. (1999). High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature Genetics*, 21(1 Suppl), 20-24.
- Liu, H. L., Kang, Y. W., Genin, S., Schell, M. A., & Denny, T. P. (2001). Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. *Microbiology*, 147, 3215-3229.
- Llop, P., Caruso, P., Cubero, J., Morente, C., & Lopez, M. M. (1999). A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods*, 37(1), 23-31.
- Lozano, J. C. (1986). Cassava bacterial blight: a manageable disease. *Plant Disease*, 70, 1089-1093.
- Lozano, J. C., & Sequeira, L. (1970). Differentiation of Races of *Pseudomonas solanacearum* by a Leaf Infiltration Technique. *Phytopathology*, 60, 833-838.
- Lupski, J. R., de Oca-Luna, R. M., Slaugenhaupt, S., Pentao, L., Guzzetta, V., Trask, B. J., . . . Patel, P. I. (1991). DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell*, 66(2), 219-232.

- Macho, A. P., Guidot, A., Barberis, P., Beuzon, C. R., & Genin, S. (2010). A competitive index assay identifies several *Ralstonia solanacearum* type III effector mutant strains with reduced fitness in host plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(9), 1197-1205.
- Mahbou Somo Toukam, G. (2010). *Diversité de Ralstonia solanacearum au Cameroun et bases génétiques de la résistance chez le piment (Capsicum annuum) et les Solanacées*. Philosophiæ doctor, L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech), Paris, France.
- Mahbou Somo Toukam, G., Cellier, G., Wicker, E., Guilbaud, C., Kahane, R., Allen, C., & Prior, P. (2009). Broad Diversity of *Ralstonia solanacearum* Strains in Cameroon. *Plant Disease*, 93(11), 1123-1130.
- Majewski, J., & Cohan, F. M. (1999). DNA sequence similarity requirements for interspecific recombination in *Bacillus*. *Genetics*, 153(4), 1525-1533.
- Maskos, U., & Southern, E. M. (1992). Parallel analysis of oligodeoxyribonucleotide (oligonucleotide) interactions. I. Analysis of factors influencing oligonucleotide duplex formation. *Nucleic Acids Research*, 20(7), 1675-1678.
- Maskos, U., & Southern, E. M. (1993). A study of oligonucleotide reassociation using large arrays of oligonucleotides synthesised on a glass support. *Nucleic Acids Research*, 21(20), 4663-4669.
- Maurelli, A. T. (2007). Black holes, antivirulence genes, and gene inactivation in the evolution of bacterial pathogens. *FEMS Microbiology Letters*, 267(1), 1-8.
- McCarter, S. M. (1991). Root diseases caused by bacteria: bacterial wilt. In J. B. Jones, J. P. Jones, R. E. Stall & T. A. Zitter (Eds.), *Compendium of Tomato Diseases* (pp. 28-29). St Paul, MN, U.S.A.: APS Press.
- McGarvey, J. A., Denny, T. P., & Schell, M. A. (1999). Spatial-temporal and quantitative analysis of growth and EPS I production by *Ralstonia solanacearum* in resistant and susceptible tomato cultivars. *Phytopathology*, 89(12), 1233-1239.
- Mckane, M., & Milkman, R. (1995). Transduction, restriction and recombination patterns in *Escherichia coli*. *Genetics*, 139(1), 35-43.
- Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V., & Rappuoli, R. (2005). The microbial pan-genome. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15(6), 589-594.
- Messiaen, C. M., Bérarnis, M., & Berniac, M. (1972). *Comparison of virulence of Pseudomonas solanacearum in different type of soil*. Paper presented at the 10th Annual meeting of the Caribbean Food Crop Society, Puerto-Rico.
- Messiha, N. A. S., van Bruggen, A. H. C., Franz, E., Janse, J. D., Schoeman-Weerdesteijn, M. E., Termorshuizen, A. J., & van Diepeningen, A. D. (2009). Effects of soil type, management type and soil amendments on the survival of the potato brown rot bacterium *Ralstonia solanacearum*. *Applied Soil Ecology*, 43(2-3), 206-215.
- Metzgar, D., & Wills, C. (2000). Evolutionary changes in mutation rates and spectra and their influence on the adaptation of pathogens. *Microbes and Infection*, 2(12), 1513-1522.
- Meyer, D., Cunnac, S., Gueneron, M., Declercq, C., Van Gijsegem, F., Lauber, E., . . . Arlat, M. (2006). PopF1 and PopF2, two proteins secreted by the type III protein secretion system of *Ralstonia solanacearum*, are translocators belonging to the HrpF/NopX family. *Journal of Bacteriology*, 188(13), 4903-4917.
- Milkman, R., Raleigh, E. A., McKane, M., Cryderman, D., Bilodeau, P., & McWeeny, K. (1999). Molecular evolution of the *Escherichia coli* chromosome. V. Recombination patterns among strains of diverse origin. *Genetics*, 153(2), 539-554.

- Milling, A., Meng, F., Denny, T. P., & Allen, C. (2009). Interactions with hosts at cool temperatures, not cold tolerance, explain the unique epidemiology of *Ralstonia solanacearum* Race 3 biovar 2. *Phytopathology*, 99(10), 1127-1134.
- Mir, K. U., & Southern, E. M. (2000). Sequence variation in genes and genomic DNA: methods for large-scale analysis. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 1, 329-360.
- Mira, A., Ochman, H., & Moran, N. A. (2001). Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. *Trends in Genetics*, 17(10), 589-596.
- Mira, A., Pushker, R., & Rodriguez-Valera, F. (2006). The Neolithic revolution of bacterial genomes. *Trends in Microbiology*, 14(5), 200-206.
- Mitsuhashi, M. (1996). Technical report: Part 1. Basic requirements for designing optimal oligonucleotide probe sequences. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 10(5), 277-284.
- Moran, N. A. (2002). Microbial minimalism: Genome reduction in bacterial pathogens. *Cell*, 108(5), 583-586.
- Moran, N. A., & Plague, G. R. (2004). Genomic changes following host restriction in bacteria. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14(6), 627-633.
- Moreira, D., & Lopez-Garcia, P. (2002). The molecular ecology of microbial eukaryotes unveils a hidden world. *Trends in Microbiology*, 10(1), 31-38.
- Mukaihara, T., & Tamura, N. (2009). Identification of novel *Ralstonia solanacearum* type III effector proteins through translocation analysis of hrpB-regulated gene products. *Microbiology*.
- Nakamura, Y., Itoh, T., Matsuda, H., & Gojobori, T. (2004). Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes. *Nature Genetics*, 36(7), 760-766.
- Nap, J. P., & Bisseling, T. (1990). Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: the legume root nodule. *Science*, 250(4983), 948-954.
- Nelson, L. M., & Child, J. J. (1981). Nitrogen fixation and hydrogen metabolism by *Rhizobium leguminosarum* isolates in pea root nodules. *Canadian Journal of Microbiology*, 27(10), 1028-1034.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B. F., & Dangl, J. L. (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics*, 37, 579-609.
- O'Rourke, M., & Spratt, B. G. (1994). Further evidence for the non-clonal population structure of *Neisseria gonorrhoeae*: extensive genetic diversity within isolates of the same electrophoretic type. *Microbiology*, 140, 1285-1290.
- Ochman, H., Lawrence, J. G., & Groisman, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405(6784), 299-304.
- Ochman, H., & Wilson, A. C. (1987). Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 26(1-2), 74-86.
- Ohnishi, M., Kurokawa, K., & Hayashi, T. (2001). Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? *Trends in Microbiology*, 9(10), 481-485.
- Opina, N., Tavner, F., Hollway, G., Wang, J. F., Li, T. H., Maghirang, R., . . . Timmis, J. N. (1997). A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 5, 12.

- Orgambide, G., Montrozier, H., Servin, P., Roussel, J., Trigalet-Demery, D., & Trigalet, A. (1991). High heterogeneity of the exopolysaccharides of *Pseudomonas solanacearum* strain GMI 1000 and the complete structure of the major polysaccharide. *Journal of Biological Chemistry*, 266(13), 8312-8321.
- Ozakman, M., & Schaad, N. W. (2003). A real-time BIO-PCR assay for detection of *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2, in asymptomatic potato tubers. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 25(3), 232-239.
- Ozakman, N., & Schaad, N. W. (2002). *Specific detection of Ralstonia solanacearum race 3, biovar 2, causal agent of brown rot of potato, in latent infected tubers using a real-time BIO-PCR assay*. Paper presented at the 6th International Conference on *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens, Acquafredda di Maratea, Italy.
- Pallen, M. J., & Wren, B. W. (2007). Bacterial pathogenomics. *Nature*, 449(7164), 835-842.
- Palleroni, N. J. (1984). Family I. *Pseudomonaceae*. Genus I. *Pseudomonas*. In N. R. Krieg & J. G. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 1, pp. 141-219). Baltimore: Williams and Wilkins.
- Palleroni, N. J., & Doudoroff, M. (1971). Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, 107, 690-696.
- Palys, T., Berger, E., Mitrica, I., Nakamura, L., & Cohan, F. (2000). Protein-coding genes as molecular markers for ecologically distinct populations: the case of two *Bacillus* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(3), 1021-1028.
- Palys, T., Nakamura, L. K., & Cohan, F. M. (1997). Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(4), 1145-1156.
- Parkhill, J., Wren, B. W., Thomson, N. R., Titball, R. W., Holden, M. T. G., Prentice, M. B., . . . Barrell, B. G. (2001). Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*, 413(6855), 523-527.
- Pegg, K. G., & Moffett, M. (1971). Host range of the ginger strain of *Pseudomonas solanacearum* in Queensland. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, 11, 696-698.
- Perez-Martin, J., & de Lorenzo, V. (1997). Clues and consequences of DNA bending in transcription. *Annual Review of Microbiology*, 51, 593-628.
- Persley, G. J. (1986). *Ecology of Pseudomonas solanacearum, the causal agent of bacterial wilt*. Paper presented at the Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific: proceedings n°13 of an international workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines, 8-10 October 1985, Canberra, Australia.
- Persley, G. J., Batugal, P., Gaspasin, D., & Vander Zaag, P. (1986). *Summary of discussion and recommendations*. Paper presented at the Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific: proceedings n°13 of an international workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines, 8-10 October 1985, Canberra, Australia.
- Petrov, D. A. (2001). Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends in Genetics*, 17(1), 23-28.
- Pollack, J. R., & Iyer, V. R. (2002). Characterizing the physical genome. *Nature Genetics*, 32 Suppl, 515-521.
- Poueymiro, M., Cunnac, S., Barberis, P., Deslandes, L., Peeters, N., Cazale-Noel, A. C., . . . Genin, S. (2009). Two type III secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum* GMI1000 determine host-range specificity on tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(5), 538-550.
- Poueymiro, M., & Genin, S. (2009). Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Current Opinion in Microbiology*, 12(1), 44-52.

- Poussier, S., Cheron, J. J., Couteau, A., & Luisetti, J. (2002). Evaluation of procedures for reliable PCR detection of *Ralstonia solanacearum* in common natural substrates. *Journal of Microbiological Methods*, 51(3), 349-359.
- Poussier, S., & Luisetti, J. (2000). Specific detection of biovars of *Ralstonia solanacearum* in plant tissues by Nested-PCR-RFLP. *European Journal of Plant Pathology*, 106(3), 255-265.
- Poussier, S., Prior, P., Luisetti, J., Hayward, C., & Fegan, M. (2000). Partial sequencing of the *hrpB* and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Systematic and Applied Microbiology*, 23(4), 479-486.
- Poussier, S., Thoquet, P., Trigalet-Demery, D., Barthet, S., Meyer, D., Arlat, M., & Trigalet, A. (2003). Host plant-dependent phenotypic reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to pathogenic forms via alterations in the *phcA* gene. *Molecular Microbiology*, 49(4), 991-1003.
- Poussier, S., Trigalet-Demery, D., Vandewalle, P., Goffinet, B., Luisetti, J., & Trigalet, A. (2000). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. *Microbiology*, 146 (Pt 7), 1679-1692.
- Poussier, S., Vandewalle, P., & Luisetti, J. (1999). Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hrp* gene region. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 2184-2194.
- Pradhanang, P. M., Elphinstone, J. G., & Fox, R. T. V. (2000a). Identification of crop and weed hosts of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in the hills of Nepal. *Plant Pathology*, 49, 403-413.
- Pradhanang, P. M., Elphinstone, J. G., & Fox, R. T. V. (2000b). Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil: a comparison of different detection techniques. *Plant Pathology*, 49, 414-422.
- Preston, G. M., Haubold, B., & Rainey, P. B. (1998). Bacterial genomics and adaptation to life on plants: implications for the evolution of pathogenicity and symbiosis. *Current Opinion in Microbiology*, 1(5), 589-597.
- Prior, P., & Fegan, M. (2005). Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. *Acta Horticulturae*, 695, 127-136.
- Prior, P., Grimault, V., & Schmit, J. (1994). Resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) in tomato: present status and prospect. In A. C. Hayward & G. L. Hartman (Eds.), *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (pp. 209-223). Wallingford, United Kingdom: CAB International.
- Protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community, Council Directive 2000/29/EC C.F.R. (2000).
- Puhler, A., Arlat, M., Becker, A., Gottfert, M., Morrissey, J. P., & O'Gara, F. (2004). What can bacterial genome research teach us about bacteria-plant interactions? *Current Opinion in Plant Biology*, 7(2), 137-147.
- Purcell, A. H., & Hopkins, D. L. (1996). Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annual Review of Microbiology*, 34, 131-151.
- Ralston, E., Palleroni, N. J., & Doudoroff, M. (1973). *Pseudomonas pickettii*, a new species of clinical origin related to *Pseudomonas solanacearum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 23(1), 15-19.
- Rao, B. J., Chiu, S. K., Bazemore, L. R., Reddy, G., & Radding, C. M. (1995). How specific is the first recognition step of homologous recombination? *Trends in Biochemical Sciences*, 20(3), 109-113.
- Raymundo, A. K., Orlina, M. E., Lavina, W. A., & Opina, N. L. (2005). Comparative genome plasticity of tomato and banana strains of *Ralstonia solanacearum* in the Philippines. In C. Allen, P. Prior & A. C. Hayward

- (Eds.), *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex* (pp. 387-393). St Paul, MN: American Phytopathological Society (APS Press).
- Remenant, B., Coupat-Goutaland, B., Guidot, A., Cellier, G., Wicker, E., Allen, C., . . . Prior, P. (2010). Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics*, 11, 379.
- Roberts, S. J., Eden-Green, S. J., Jones, P., & Ambler, D. J. (1990). *Pseudomonas syzygii*, sp. nov., the cause of Sumatra disease of cloves. *Systematic and Applied Microbiology*, 13, 34-43.
- Robertson, A. E., Wechter, W. P., Denny, T. P., Fortnum, B. A., & Kluepfel, D. A. (2004). Relationship between avirulence gene (*avrA*) diversity in *Ralstonia solanacearum* and bacterial wilt incidence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(12), 1376-1384.
- Roperos, N. I. (1965). Note on the occurrence of a new disease of cooking banana in the Philippines. *Coffee and Cacao Journal*, 8, 135-136.
- Rorer, J. B. (1911). A bacterial disease of bananas and plantains. *Phytopathology*, 1, 45-49.
- Rosenberg, C., Casse-Delbart, F., Dusha, I., David, M., & Boucher, C. (1982). Megaplasms in the plant-associated bacteria *Rhizobium meliloti* and *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, 150(1), 402-406.
- Rychlik, W., & Rhoads, R. E. (1989). A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 17(21), 8543-8551.
- Saddler, G. S. (2005). Management of bacterial wilt disease. In C. Allen, P. Prior & A. C. Hayward (Eds.), *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex* (pp. 121-132). St Paul, MN: American Phytopathological Society (APS Press).
- Saile, E., McGarvey, J. A., Schell, M. A., & Denny, T. P. (1997). Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology*, 87, 1264-1271.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., . . . Boucher, C. A. (2002). Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*, 415(6871), 497-502.
- SantaLucia, J., Jr. (1998). A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(4), 1460-1465.
- SantaLucia, J., Jr., Allawi, H. T., & Seneviratne, P. A. (1996). Improved nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability. *Biochemistry*, 35(11), 3555-3562.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria* (3rd edition). Saint Paul: APS Press.
- Schell, M. A. (2000). Control of Virulence and Pathogenicity Genes of *Ralstonia solanacearum* by an Elaborate Sensory Network. *Annual Review of Phytopathology*, 38, 263-292.
- Schenk, P. E. (1971). Southeastern Atlantic Canada, northwestern Africa, and continental drift. *Canadian Journal of Earth Sciences*, 8, 1218-1251.
- Scherlach, K., Partida-Martinez, L. P., Dahse, H. M., & Hertweck, C. (2006). Antimitotic rhizoxin derivatives from a cultured bacterial endosymbiont of the rice pathogenic fungus *Rhizopus microsporus*. *Journal of the American Chemical Society*, 128(35), 11529-11536.

- Schmit, J. (1978). *Microscopic study of early stages of infection by Pseudomonas solanacearum E.F.S. on in "vitro" grown tomato seedlings*. Paper presented at the Proceedings on the Fourth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Anger, France.
- Schönfeld, J., Gelsomino, A., van Overbeek, L. S., Gorissen, A., Smalla, K., & van Elsas, J. D. (2003). Effects of compost addition and simulated solarisation on the fate of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 and indigenous bacteria in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 43(1), 63-74.
- Schönfeld, J., Heuer, H., Van Elsas, J. D., & Smalla, K. (2003). Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of fliC fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7248-7256.
- Seal, S. E. (1998). Molecular methods for detection and discrimination of *Ralstonia solanacearum*. In P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone (Eds.), *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects* (pp. 103-109). Paris, France: INRA Editions.
- Seal, S. E., & Elphinstone, J. G. (1994). Advances in identification and detection of *Pseudomonas solanacearum*. In A. C. Hayward & G. L. Hartman (Eds.), *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (pp. 35-57). Wallingford, United Kingdom: CAB International.
- Seal, S. E., Jackson, L. A., & Daniels, M. J. (1992). Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3759-3761.
- Seal, S. E., Jackson, L. A., Young, J. P., & Daniels, M. J. (1993). Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Journal of General Microbiology*, 139(7), 1587-1594.
- Seal, S. E., Taghavi, M., Fegan, N., Hayward, A. C., & Fegan, M. (1999). Determination of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* rDNA subgroups by PCR tests. *Plant Pathology*, 48(1), 115-120.
- Selander, R. K., & Musser, J. M. (1990). Population genetics of bacterial pathogenesis. In B. H. Iglewski & V. L. Clark (Eds.), *Molecular basis of bacterial pathogenesis* (pp. 11-36). San Diego, California: Academic Press.
- Sequeira, L. (1985). Surface components involved in bacterial pathogen-plant host recognition. *Journal of Cell Science Supplements*, 2, 301-316.
- Sequeira, L. (1993). *Bacterial wilt: past, present, and future*. Paper presented at the Bacterial Wilt. ACIAR Proceedings No. 45, Canberra, Australia.
- Sequeira, L. (1998). Bacterial wilt: the missing element in international banana improvement programs. In P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone (Eds.), *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects* (pp. 6-14). Paris, France: INRA Editions.
- Shiomi, Y., Nishiyama, M., Onizuka, T., & Marumoto, T. (1999). Comparison of bacterial community structures in the rhizosphere of tomato plants grown in soils suppressive and conducive towards bacterial wilt. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 3996-4001.
- Siefert, J. L. (2009). Defining the mobilome. *Methods in Molecular Biology*, 532, 13-27.
- Sioud, M., & Cekaite, L. (2010). Profiling of miRNA expression and prediction of target genes. *Methods in Molecular Biology*, 629, 257-271.
- Smith, J. J., Offord, L. C., Holderness, M., & Saddler, G. S. (1995). Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 4263-4268.

- Smith, J. M., Dowson, C. G., & Spratt, B. G. (1991). Localized Sex in Bacteria. *Nature*, 349(6304), 29-31.
- Smith, J. M., Smith, N. H., O'Rourke, M., & Spratt, B. G. (1993). How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(10), 4384-4388.
- Sneath, P. (1977). The maintenance of large numbers of strains of microorganisms, and the implications for culture collections. *FEMS Microbiology Letters*, 1(6), 333-334.
- Soguilon, C. E., Magnaye, L. B., & Natural, M. P. (1994). Bugtok disease of cooking bananas: I. Etiology of the disease and diagnostic symptoms. *Philippine Phytopathology*, 30, 26-34.
- Southern, E., Mir, K., & Shchepinov, M. (1999). Molecular interactions on microarrays. *Nature Genetics*, 21(1 Suppl), 5-9.
- Southern, E. M. (1974). An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose. *Analytical Biochemistry*, 62(1), 317-318.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kampfer, P., Maiden, M. C., . . . Whitman, W. B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(Pt 3), 1043-1047.
- Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4), 846-849.
- Supriadi. (2005). Present status of Blood Disease in Indonesia. In C. Allen, P. Prior & A. C. Hayward (Eds.), *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex* (pp. 395-404). St Paul, MN: American Phytopathological Society (APS Press).
- Suzuki, I., Dular, U., & Kwok, S. C. (1974). Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. *Journal of Bacteriology*, 120(1), 556-558.
- Swanson, J. K., Yao, J., Tans-Kersten, J., & Allen, C. (2005). Behavior of *Ralstonia solanacearum* Race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium. *Phytopathology*, 95(2), 136-143.
- Tabacchioni, S., Visca, P., Chiarini, L., Bevivino, A., Di Serio, C., Fancelli, S., & Fani, R. (1995). Molecular characterization of rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. *Research in Microbiology*, 146(7), 531-542.
- Taghavi, M., Hayward, C., Sly, L. I., & Fegan, M. (1996). Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(1), 10-15.
- Taillon-Miller, P., Gu, Z., Li, Q., Hillier, L., & Kwok, P. Y. (1998). Overlapping genomic sequences: a treasure trove of single-nucleotide polymorphisms. *Genome Research*, 8(7), 748-754.
- Takahashi, M., Kobayashi, H., & Iwasaki, S. (1989). Rhizoxin resistant mutants with an altered beta-tubulin gene in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and General Genetics*, 220(1), 53-59.
- Tans-Kersten, J., Brown, D. G., & Allen, C. (2004). Swimming motility, a virulence trait of *Ralstonia solanacearum*, is regulated by *FlhDC* and the plant host environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(6), 686-695.
- Tans-Kersten, J., Guan, Y., & Allen, C. (1998). *Ralstonia solanacearum* pectin methylesterase is required for growth on methylated pectin but not for bacterial wilt virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4918-4923.
- Tans-Kersten, J., Huang, H., & Allen, C. (2001). *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of Bacteriology*, 183(12), 3597-3605.

- Templeton, A. R. (1989). *The meaning of species and speciation : A genetic perspective*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer.
- Tettelin, H., Masignani, V., Cieslewicz, M. J., Donati, C., Medini, D., Ward, N. L., . . . Fraser, C. M. (2005). Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13950-13955.
- Tettelin, H., Riley, D., Cattuto, C., & Medini, D. (2008). Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Current Opinion in Microbiology*, 11(5), 472-477.
- Thoquet, P., Oliver, J., Sperisen, C., Rogowsky, P., Prior, P., Anaïs, G., . . . Grimsley, N. (1996). Polygenic resistance of tomato plants to bacterial wilt in the French West Indies. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9, 837-842.
- Thwaites, R., Eden-Green, S. J., & Black, R. (2000). Diseases caused by bacteria. In D. R. Jones (Ed.), *Diseases of Banana, Abac and Enset* (pp. 213-239). Wallingford, United Kingdom: CABI Publishing.
- Thwaites, R., Mansfield, J., Eden-Green, S., & Seal, S. (1999). RAPD and rep PCR-based fingerprinting of vascular bacterial pathogens of *Musa* spp. *Plant Pathology*, 48(1), 121-128.
- Timms-Wilson, T. M., Bryant, K., & Bailey, M. J. (2001). Strain characterization and 16S-23S probe development for differentiating geographically dispersed isolates of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Environmental Microbiology*, 3(12), 785-797.
- Titarenko, E., Lopez-Solanilla, E., Garcia-Olmedo, F., & Rodriguez-Palenzuela, P. (1997). Mutants of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* sensitive to antimicrobial peptides are altered in their lipopolysaccharide structure and are avirulent in tobacco. *Journal of Bacteriology*, 179(21), 6699-6704.
- Tobe, T., Beatson, S. A., Taniguchi, H., Abe, H., Bailey, C. M., Fivian, A., . . . Pallen, M. J. (2006). An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(40), 14941-14946.
- Toft, C., & Andersson, S. G. (2010). Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial host adaptation. *Nature Reviews Genetics*, 11(7), 465-475.
- Trigalet, A., Frey, P., & Trigalet-Demery, D. (1994). Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: state of the art and understanding. In A. C. Hayward & G. L. Hartman (Eds.), *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (pp. 225-233). Wallingford, United Kingdom: CAB International.
- Uchino, K., Saito, T., & Jendrossek, D. (2008). Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZa1 is involved in mobilization of accumulated PHB in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4), 1058-1063.
- Ueda, K., Yamashita, A., Ishikawa, J., Shimada, M., Watsuji, T. O., Morimura, K., . . . Beppu, T. (2004). Genome sequence of *Symbiobacterium thermophilum*, an uncultivable bacterium that depends on microbial commensalism. *Nucleic Acids Research*, 32(16), 4937-4944.
- Valls, M., Genin, S., & Boucher, C. (2006). Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathogens*, 2(8), 798-807.
- Van Alfen, N. K. (1989). Reassessment of plant wilt toxin. *Annual Review of Phytopathology*, 27, 533-550.
- van der Wolf, J. M., Bonants, P. J. M., Smith, J. J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., van Beckhoven, J. R. C. M., . . . Feuillade, R. (1998). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* race 3 in Western Europe determined by AFLP, RC-PFGE and Rep-PCR. In P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone (Eds.), *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects* (pp. 44-49). Berlin, Germany: Springer Verlag.

- van der Wolf, J. M., Vriend, S. G. C., Kastelein, P., Nijhuis, E. H., van Bekkum, P. J., & van Vuurde, J. W. L. (2000). Immunofluorescence colony-staining (IFC) for detection and quantification of *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum* biovar 2 (Race 3) in soil and verification of positive results by PCR and dilution plating. *European Journal of Plant Pathology*, 106(2), 123-133.
- Van der Zwet, T., & Keil, H. L. (1979). Fire blight: a bacterial disease of rosaceous plants *Agriculture handbook no. 510* (pp. 200). Washington, D.C.: Government Printing Office.
- van Elsas, J. D., Kastelein, P., de Vries, P. M., & van Overbeek, L. S. (2001). Effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* bv. 2 in irrigation water. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(9), 842-854.
- van Elsas, J. D., Kastelein, P., van Bekkum, P., van der Wolf, J. M., de Vries, P. M., & van Overbeek, L. S. (2000). Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates. *Phytopathology*, 90(12), 1358-1366.
- van Elsas, J. D., van Overbeek, L. S., & Trigalet, A. (2005). The viable but non-culturable state in *Ralstonia solanacearum*: is there a realistic threat to our strategic concepts? In C. Allen, P. Prior & A. C. Hayward (Eds.), *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex* (pp. 103-119). St Paul, MN: American Phytopathological Society (APS Press).
- van Elsas, J. D., van Overbeek, L. S., van Bailey, M. J., Schönfeld, J., & Smalla, K. (2005). Fate of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 as affected by conditions and soil treatments in temperate climate zones. In C. Allen, P. Prior & A. C. Hayward (Eds.), *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex* (pp. 39-49). St Paul, MN: American Phytopathological Society (APS Press).
- Van Gijsegem, F., Gough, C., Zischek, C., Niqueux, E., Arlat, M., Genin, S., . . . Boucher, C. (1995). The *hrp* gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Molecular Microbiology*, 15, 1095-1114.
- Van Gijsegem, F., Vasse, J., De Rycke, R., Castello, P., & Boucher, C. (2002). Genetic dissection of the *Ralstonia solanacearum* *hrp* gene cluster reveals that the *HrpV* and *HrpX* proteins are required for *Hrp* pilus assembly. *Molecular Microbiology*, 44(4), 935-946.
- Van Spanning, R. J. M., Reijnders, W. N. M., & Stouthamer, A. H. (1995). Integration of heterologous DNA into the genome of *Paracoccus denitrificans* is mediated by a family of IS1248-related elements and a second type of integrative recombination event. *Journal of Bacteriology*, 177(16), 4772-4778.
- Vandamme, P., & Coenye, T. (2004). Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), 2285-2289.
- Vandamme, P., Goris, J., Chen, W. M., de Vos, P., & Willems, A. (2002). *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(4), 507-512.
- Vaneechoutte, M., Kämpfer, P., De Baere, T., Falsen, E., & Verschraegen, G. (2004). *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(2), 317-327.
- Vasiliskov, V. A., Prokopenko, D. V., & Mirzabekov, A. D. (2001). Parallel multiplex thermodynamic analysis of coaxial base stacking in DNA duplexes by oligodeoxyribonucleotide microchips. *Nucleic Acids Research*, 29(11), 2303-2313.
- Vasse, J., Danoun, S., & Trigalet, A. (2005). Microscopic studies of root infection in resistant tomato cultivar Hawaii 7996. In C. Allen, P. Prior & A. C. Hayward (Eds.), *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex* (pp. 285-291). St Paul, MN: American Phytopathological Society (APS Press).

- Vasse, J., de Billy, F., Camut, S., & Truchet, G. (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *Journal of Bacteriology*, 172(8), 4295-4306.
- Vasse, J., Frey, P., & Trigalet, A. (1995). Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8(2), 241-251.
- Vasse, J., Genin, S., Frey, P., Boucher, C., & Brito, B. (2000). The *hrpB* and *hrpG* regulatory genes of *Ralstonia solanacearum* are required for different stages of the tomato root infection process. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(3), 259-267.
- Vaughan, E. K. (1944). Bacterial wilt of tomato caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 34, 443-458.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., . . . Zhu, X. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507), 1304-1351.
- Villa, J. E., Tsuchiya, K., Horita, M., Natural, M., Opina, N., & Hyakumachi, M. (2005). Phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* species complex strains from Asia and other continents based on 16S rDNA, *endoglucanase*, and *hrpB* gene sequences. *Journal of General Plant Pathology*, 71(1), 39-46.
- Vojnov, A. A., do Amaral, A. M., Dow, J. M., Castagnaro, A. P., & Marano, M. R. (2010). Bacteria causing important diseases of citrus utilise distinct modes of pathogenesis to attack a common host. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), 467-477.
- Vulic, M., Dionisio, F., Taddei, F., & Radman, M. (1997). Molecular keys to speciation: DNA polymorphism and the control of genetic exchange in enterobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(18), 9763-9767.
- Wallace, R. B., Shaffer, J., Murphy, R. F., Bonner, J., Hirose, T., & Itakura, K. (1979). Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Research*, 6(11), 3543-3557.
- Waller, J. M., & Sitepu, D. (1975). Sumatra disease of cloves in Indonesia. *International Journal of Pest Management*, 21(2), 141-147.
- Wang, D. G., Fan, J. B., Siao, C. J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., . . . Lander, E. S. (1998). Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 280(5366), 1077-1082.
- Wang, J.-F., Olivier, J., Thoquet, P., Mangin, B., Sauviac, L., & Grimsley, N. H. (2000). Resistance of tomato line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(1), 6-13.
- Wang, J. F., Hanson, P., & Barnes, J. A. (1998). Worldwide evaluation of an international set of resistance sources to bacterial wilt in tomato. In P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone (Eds.), *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects* (pp. 269-275). Paris, France: INRA Editions.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., . . . Truper, H. G. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(4), 463-464.
- Weller, S. A., Elphinstone, J. G., Smith, N. C., Boonham, N., & Stead, D. E. (2000). Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 2853-2858.
- Weller, S. A., Elphinstone, J. G., Smith, N. C., & Stead, D. E. (2000). Detection of *Ralstonia solanacearum* from potato tissue by post-enrichment TaqMan PCR. *EPPO Bulletin*, 30, 381-383.

- Wenneker, M., Verdel, M. S. W., Groeneveld, R. M. W., Kempenaar, C., van Beuningen, A. R., & Janse, J. D. (1999). *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* race 3 (biovar 2) in surface water and natural weed hosts: First report on stinging nettle (*Urtica dioica*). *European Journal of Plant Pathology*, 105(3), 307-315.
- White, F. F., Yang, B., & Johnson, L. B. (2000). Prospects for understanding avirulence gene function. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(4), 291-298.
- Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., Guilbaud, C., Fegan, M., & Prior, P. (2007). *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), 6790-6801.
- Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., & Prior, P. (2009). Epidemiological evidence for the emergence of a new pathogenic variant of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies). *Plant Pathology*, 58(5), 853-851.
- Wicker, E., Grassart, L., Mian, D., Coranson Beaudu, R., Dufeal, D., Guilbaud, C., & Prior, P. (2002). *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita moschata*, and *Anthurium* spp, new hosts of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies). *Bacterial Wilt Newsletter*, 17, 20-21.
- Williams, J. C., Case-Green, S. C., Mir, K. U., & Southern, E. M. (1994). Studies of oligonucleotide interactions by hybridisation to arrays: the influence of dangling ends on duplex yield. *Nucleic Acids Research*, 22(8), 1365-1367.
- Williamson, L., Nakaho, K., Hudelson, B., & Allen, C. (2002). *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2 strains isolated from geranium are pathogenic on potato. *Plant Disease*, 86(9), 987-991.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2), 221-271.
- Wosten, M. M. (1998). Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiology Reviews*, 22(3), 127-150.
- Wren, B. W. (2000). Microbial genome analysis: insights into virulence, host adaptation and evolution. *Nature Reviews Genetics*, 1(1), 30-39.
- Wren, B. W. (2003). The Yersiniae - A model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 1(1), 55-64.
- Wullings, B. A., Van Beuningen, A. R., Janse, J. D., & Akkermans, A. D. (1998). Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA-targeted probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4546-4554.
- Xia, T., SantaLucia, J., Jr., Burkard, M. E., Kierzek, R., Schroeder, S. J., Jiao, X., . . . Turner, D. H. (1998). Thermodynamic parameters for an expanded nearest-neighbor model for formation of RNA duplexes with Watson-Crick base pairs. *Biochemistry*, 37(42), 14719-14735.
- Xu, J., Pan, Z. C., Prior, P., Xu, J. S., Zhang, Z., Zhang, H., . . . Feng, J. (2009). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. *European Journal of Plant Pathology*, 125(4), 641-653.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., . . . Arakawa, M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and Immunology*, 36(12), 1251-1275.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., & Nishiuchi, Y. (1995). Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. *Microbiology and Immunology*, 39(11), 897-904.

- Yang, C. H., Crowley, D. E., Borneman, J., & Keen, N. T. (2001). Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), 3889-3894.
- Yao, J., & Allen, C. (2006). Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, 188(10), 3697–3708.
- Ye, R. W., Wang, T., Bedzyk, L., & Croker, K. M. (2001). Applications of DNA microarrays in microbial systems. *Journal of Microbiological Methods*, 47(3), 257-272.
- Zhou, J., Xia, B., Treves, D. S., Wu, L. Y., Marsh, T. L., O'Neill, R. V., . . . Tiedje, J. M. (2002). Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 326-334.

Description of phylotype II ecotypes within *Ralstonia solanacearum* species complex:
diversity and evolution

ABSTRACT:

The studied model is the vascular plant pathogen *Ralstonia solanacearum*, with a particular focus on phylotype II strains. This telluric bacterium has a wide diversity, both on genotypic and phenotypic levels. Its evolving classification reflects the need to clarify its unusual biodiversity and seek to identify ecotype structure in this species complex, i.e., groups of strains with both genotypic and specific biological traits. Within the framework of this model pathosystem, we initially focused on deeply revisiting pathotypes among ecotypes, although well described in the literature, or describing new ecotypes (African phylotype III). We observed high phenotypic convergence between strains from phylotype III from the African highlands and Brown rot strains from phylotype IIB-1, both able to trigger wilt symptoms on potato and other Solanaceae at cold temperatures. Adaptation of diverse strains for cold tolerance led us to investigate the *R. solanacearum* situation in Europe and more specifically in the Mediterranean regions. This strategy allowed us to appreciate the significant divergence towards pathogenicity (virulence and aggressiveness) on Solanaceae within clonal-like structure of strains in the Brown rot ecotype, which also established latent interactions in the banana vascular system. In the mean time, phenotypes of banana pathogenic strains unifying the Moko ecotype, was also revisited on Solanaceae, and was able to trigger symptoms on both susceptible and resistant genetic resources to bacterial wilt. All these experimental data yielded selection criteria for choosing three new candidate strains in the *R. solanacearum* species complex for complete genome sequencing. Our genomic comparative approach allowed us to describe the first pangenome of this pathogen: all targeted identified genes of this species complex. These data were analyzed by various bioinformatic approaches and allowed us to design a complete reshaping of *R. solanacearum* species complex into three distinct genomic species, firstly clustering strains from phylotype I (Asia) with strains from phylotype III (Africa); strains from phylotype II (America); and lastly, strains from phylotype IV (Indonesia). This pangenome was then used for designing a DNA microarray, a high resolution tool that allowed us to explore a wide set of genomes. The density of accumulated data allowed for a molecular ecological approach to retrieve a certain amount of the evolutionary past of *R. solanacearum* phylotype II strains. Furthermore, a deeper analysis of these genomic data, combining phylogeography with population structure analysis of the Brown rot ecotype, revealed a dual epidemic situation in Europe, both across Andean and African influences. Similarly, the Moko ecotype presents three distinct genetic structures. These data were analyzed within the purpose of tracking the main gene flows in the ancestral states of phylotypes and to unravel the strong contribution of the mobile elements, genes related to environmental adaptation, and pathogenicity as a major driving force into the evolution of this successful plant pathogen.

DISCIPLINE: Molecular Biology

KEY WORDS: diversity, phenotype, genotype, pangenome, postgenomic, *Ralstonia solanacearum*, evolution, pathogenicity.

Entitlement and address of the Laboratory: UMR PVBMT – CIRAD/Université de la Réunion – Pôle de Protection des Plantes (3P) - 7 chemin de l'Irat 97410 SAINT PIERRE

RÉSUMÉ :

Le modèle étudié est l'agent phytopathogène vasculaire *Ralstonia solanacearum*, en portant une attention particulière aux souches de phylotype II. Cette bactérie d'origine tellurique est très diversifiée, tant au plan génétique que phénotypique. Sa classification en constante évolution témoigne d'une volonté de clarifier cette biodiversité inhabituellement forte, tout en cherchant à reconnaître les écotypes structurant ce complexe d'espèces, i.e., des groupes de souches partageant à la fois des traits génotypiques et biologiques spécifiques. Dans le cadre de ce pathosystème modèle, nous nous sommes attachés dans un premier temps à revisiter de façon précise les pathotypes au sein d'écotypes bien décrits dans la littérature, ou à en faire la description (phylotype III africain). Nous avons observé une forte convergence phénotypique entre les souches de phylotype III des hauts plateaux africains et les souches Brown rot de phylotype IIB-1, capables de flétrir la pomme de terre et d'autres Solanacées à température froide. L'adaptation de souches aussi diverses pour la tolérance au froid nous a conduits à dresser un bilan de la situation *R. solanacearum* en Europe et *in extenso* dans le bassin méditerranéen. Cette approche a permis d'apprécier les degrés de divergence significative dans le pouvoir pathogène (virulence et agressivité) sur Solanaceae au sein de souches quasi clonales unifiant l'écotype Brown rot, qui s'établissent aussi sous forme d'infections latentes dans les tissus vasculaires de bananiers (Musacées). Dans le même temps, le phénotype de souches pathogènes du bananier, unifiant l'écotype Moko, a aussi été revisité sur Solanaceae qu'elles parviennent à flétrir, y compris des ressources génétiques résistantes au flétrissement bactérien. L'ensemble de ces données expérimentales a permis de dégager les critères de sélection pour le choix de trois nouvelles souches du complexe d'espèces *R. solanacearum*, dont nous avons obtenu les séquences génomiques. Notre approche en génomique comparative a permis de décrire le premier pangénome chez cet agent pathogène : l'ensemble des gènes repérés de l'espèce. Ces données ont été exploitées par différentes approches bio-informatiques et permettent de concevoir une refonte pertinente du complexe d'espèces *R. solanacearum* en trois nouvelles espèces génomiques, regroupant les souches de phylotypes I (Asie) et III (Afrique) d'une part, puis les souches de phylotype II (Amérique), et enfin les souches de phylotype IV (Indonésie) d'autre part. Ce pangénome a ensuite été exploité en concevant et développant une puce à ADN, un outil permettant l'exploration à haut débit d'une grande quantité de souches. La densité des données expérimentales accumulées permet une démarche vers l'écologie moléculaire et de reconstituer certains pans du passé évolutif des souches de phylotype II chez *R. solanacearum*. Par ailleurs, l'analyse approfondie de ces données de génomique, associant phylogéographie et structuration des populations de l'écotype Brown rot, montre une double situation épidémiologique en Europe, recoupant des influences andines et africaines. De la même façon, l'écotype Moko présente trois structures génétiques distinctes. Ces données ont été analysées de manière à retracer les principaux flux de gènes dans les états ancestraux des phylotypes et de dégager la forte contribution de la partie mobile du génome, des gènes relatifs à l'adaptation environnementale et à la pathogénie, comme moteurs dans l'évolution de cet important organisme phytopathogène.

DISCIPLINE : Biologie Moléculaire

MOTS-CLÉS : Diversité, phénotype, génotype, pangénome, postgénomique, *Ralstonia solanacearum*, évolution, pathogénie.

INTITULÉ ET ADRESSE DU LABORATOIRE : UMR PVBMT – CIRAD/Université de la Réunion – Pôle de Protection des Plantes (3P) - 7 chemin de l'Irat 97410 SAINT PIERRE
